

Aus dem Institut für Klinische Chemie  
an den Universitätskliniken  
der Justus Liebig-Universität Gießen  
Direktor: Prof. Dr. med. L. Róka

---

# Die PROKOLLAGEN-induzierte Plättchenaggregation und Möglichkeiten ihrer Hemmung

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Margarete Heinrich  
aus Bukarest

Gießen, Juli 1970





Digitized by the Internet Archive  
in 2026



Aus dem Institut für Klinische Chemie  
an den Universitätskliniken  
der Justus Liebig-Universität Gießen  
Direktor: Prof. Dr. med. L. Róka

---

# Die PROKOLLAGEN-induzierte Plättchenaggregation und Möglichkeiten ihrer Hemmung

Inaugural-Dissertation  
zur Erlangung des Doktorgrades  
der Medizinischen Fakultät  
der Justus Liebig-Universität Gießen

vorgelegt von  
Margarete Heinrich  
aus Bukarest

Gießen, Juli 1970



Dekan: Prof. Dr. med. Habermann

Referent: Prof. Dr. med. L. Róka

Korreferent: Priv.Do. Dr. D. Heene

Meinen Eltern

in Dankbarkeit gewidmet

|                                                                                                                             | Seite |
|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|-------|
| A. Einleitung                                                                                                               | 1     |
| B. Material                                                                                                                 | 4     |
| C. Methode und Methodenkritik                                                                                               | 7     |
| D. Ergebnisse                                                                                                               | 17    |
| I. Plättchenaggregation                                                                                                     | 17    |
| 1. Zusammenstellung aller durch Human-Prokollagen-induzierten Plättchenaggregationen mit Thrombozyten verschiedener Spender | 17    |
| 2. Vergleich der Plättchenaggregationen, ausgelöst durch Human-, Ratten- und Kalbs-Kollagen                                 | 25    |
| 3. Vergleich der ADP-, Arterienol-und Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation                                          | 28    |
| 4. Abhängigkeit der Plättchenaggregation von der Prokollagen-Konzentration                                                  | 29    |
| 5. Abhängigkeit der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation vom Plättchenalter                                         | 31    |
| 6. Abhängigkeit der Plättchenaggregation von der Beschaffenheit des Prokollagens                                            | 36    |
| 6.1. Vorinkubation des Prokollagens bei verschiedenen Temperaturen                                                          | 36    |
| 7. Abhängigkeit der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation von der Temperatur                                         | 39    |
| II. Hemmung der Plättchenaggregation                                                                                        | 41    |
| 8. Gesamtübersicht aller auf die Hemmung der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation hin untersuchten Substanzen       | 41    |
| 8.1. Gruppe der wirksamsten Hemmstoffe                                                                                      | 42    |
| 8.2. Gruppe der wichtigsten Stoffe ohne hemmende Wirkung auf die Plättchenaggregation                                       | 44    |
| 9. Übersicht über die hemmende Wirkung von 15 Salicylsäure-Derivaten auf die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation    | 45    |
| 9.1. Hemmung der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation durch Acetyl-Salicylsäure bei verschiedenen Spendern          | 49    |
| 9.2. Art der Acetyl-Salicylsäure-Hemmung                                                                                    | 52    |
| 9.3. Vergleich der hemmenden Wirkung von Acetyl-Salicylsäure und Phenylbutazon                                              | 53    |

|                                                                                                                                                 |    |
|-------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------------|----|
| 9.4. Hemmung der Plättchenaggregation durch Phenylbutazon und dessen Derivate in vivo                                                           | 55 |
| 10. Hemmung der Plättchenaggregation durch Adenosin-Derivate                                                                                    | 57 |
| 10.1. Abhängigkeit der Hemmung der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation von der cycl.AMP-Konzentration                                  | 58 |
| 10.2. Vergleich der hemmenden Wirkung von Adenosin-Derivaten auf die durch ADP-, Arterenol- und Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation     | 59 |
| 11. Gegenseitige Beeinflussung von Purin- und Adenosin-Derivaten in ihrer hemmenden Wirkung auf die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation | 63 |
| E. Diskussion                                                                                                                                   | 65 |
| F. Zusammenfassung                                                                                                                              | 85 |
| Literatur                                                                                                                                       | 87 |

## A. E I N L E I T U N G

Thrombozyten aggregieren in Gegenwart verschiedener Stoffe. Im einzelnen sind in der Literatur folgende Substanzen beschrieben:

ADP (3, 16, 21, 22, 25, 33, 43)  
Adrenalin und Noradrenalin (32, 41, 42, 50, 56, 58)  
Kollagen bzw. Prokollagen (21, 44)  
Thrombin (15, 44)  
Ionen ( $\text{Ca}^{++}$ ) (4, 11)  
Polyanionen (19, 21)  
Polykationen (19, 21)  
Viren (44)  
Bakterien (44)  
AG-AK-Komplexe (6, 15, 34, 44)  
Hitzeaggregiertes Gamma-Globulin (6, 34)  
Langkettige Fettsäuren (23, 38)  
Latex, Glas, Kaolin etc. (38)

Die Thrombozytenaggregation erscheint in vivo für die Blutstillung nach Eröffnung eines Gefäßes und für die physiologische Gefäßwandreparatur nach Mikroläsionen des Endothels von zentraler Bedeutung (8, 53). Innerhalb von wenigen Sekunden kommt es am Ort des Gefäßwanddefektes zur Adhäsion von Plättchen mit nachfolgender Aggregation weiterer Plättchen, die sich dann im Sinne der viskösen Metamorphose umbilden.

Im elektronenoptischen Bild sieht man 4 min nach der Endothel-läsion bereits eine 1-2 Zellen dicke Lage von degranulierten Plättchen und vereinzelt Plättchenaggregate, die den Endotheldefekt überkleiden (47). Dabei ist auffallend, daß die Plättchen nicht am Endothel, sondern an der Basalmembran haften und diese Haftung enger (10-20  $\mu$ ) ist als der Abstand zwischen aggregierten Plättchen (30-60  $\mu$ ). Diese neue, durch Plättchenaggregation gebildete, fest haftende Barriere zwischen Blut und Bindegewebe findet man noch nach 72 Std. (30).

An der Thrombozytenaggregation, die offenbar eine Voraussetzung für die Intaktheit der Gefäße und Kapillaren ist, sind Gefäßwandfaktoren, Thrombozyten und Plasmafaktoren beteiligt.

Von den untersuchten Gefäßwandkomponenten scheint nur Kollagen bzw. Prokollagen die Fähigkeit zur Fixation von Thrombozyten mit nachfolgender Aggregation und visköser Metamorphose zu haben (ZUCKER und BORELLI, 61).

Von den bekannten, plättchenaggregierenden Plasmafaktoren scheinen ADP, Adrenalin und Thrombin eine physiologische Bedeutung zu haben. Die ADP- und Adrenalin-induzierte Plättchenaggregation ist reversibel und erscheint so wenig geeignet, einen dauerhaften und dichten Abschluß einer Gefäßwandläsion zu bilden.

Thrombin induziert zwar wie Prokollagen eine irreversible Thrombozytenaggregation, benötigt aber zu seiner Bildung eine Latenzphase. Somit ist zumindest eine Mitwirkung bei der Thrombozytenadhäsion am Orte einer Endothelläsion unwahrscheinlich, da diese sofort erfolgt. Daß die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation auf einer indirekten Thrombinwirkung beruht, erscheint ebenfalls unwahrscheinlich, da weder eine Dicoumarin-Therapie mit sehr geringen Quickwerten in vivo noch ein Zusatz von Antithrombin (Liquemin) in vitro einen hemmenden Effekt auf die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation haben.

Ist die Thrombozytenaggregation in vivo überschießend, gerät die physiologische Gefäßwandreparatur außer Kontrolle; es kommt zur Thrombose (SPAET, ERICHSON, 53). MURPHY und MUSTARD (35, 36, 37) haben bereits vor 10 Jahren auf die Bedeutung solcher Plättchenaggregate an der geschädigten Gefäßwand im Hinblick auf die Entstehung der Thrombose hingewiesen.

Die häufige Beobachtung, daß an der Stelle der Gefäßendothelläsion Thrombozytenaggregate entstehen, ohne daß lichtmikroskopisch Kollagenfasern zu sehen sind, spricht nicht gegen die Bedeutung des Kollagens als möglichen Starter einer orts-

ständigen Thrombozytenaggregation. D. HEINRICH (21) konnte nämlich zeigen, daß für die Plättchenaggregation in erster Linie Prokollagen verantwortlich ist.

Das Anliegen der vorliegenden Arbeit ist

1. zu zeigen, daß die von D. HEINRICH (21) untersuchte Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation keine artspezifische Reaktion ist, sondern gleichermaßen mit Human-, Kalbs- und Rattenprokollagen auslösbar ist,
2. durch systematische Untersuchung von Substanzen Hemmstoffe der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation zu finden - mit dem Ziel, sie für eine wirkungsvollere Thromboseprophylaxe einzusetzen.

## B. M A T E R I A L

### Herstellung von plättchenreichem Plasma (PRP)

Humanblut mittels Blutentnahmekanüle aus der Cubitalvene in 10 ml oder 20 ml Plastik-Spritzen abgenommen, die als Stabilisator 1/10 Vol. 3,8% Na-Citrat enthalten. Blut nach Entnahme mit Stabilisator gut durchmischt und in Plastik-Reagenzröhrchen umgefüllt (Durchmesser 1 cm). Spontansedimentation abgewartet. Wenn die Spontansedimentation nach 60-90 min nicht ausreichend erfolgt ist, leichte Zentrifugation bei ca 200 g. Der gelbliche, trübe Überstand (PRP) mit Eppendorf-Plastikpipetten abgezogen und in Plastik-Reagenzröhrchen aufbewahrt.

### Herstellung von plättchenarmem Plasma (PAP)

PRP 20 min bei ca 2500 g zentrifugiert. Überstand mit Eppendorf-Pipette abgezogen und in Plastik-Reagenzröhrchen aufbewahrt.

### Herstellung von Ratten-Prokollagen

Material: tiefgefrorene Rattenschwänze. Die Haut abgezogen, in kleine Stücke zerschnitten und gewogen. Die 10fache Menge 0,1 M Citrat-Puffer pH 3,7 hinzugeben. Das Ganze unter Zusatz von 1 mg% Neomycinsulfat 24 h bei 4°C quellen lassen. Gequollene Hautstücke mittels Tonsieb von Pufferflüssigkeit getrennt und im Star-Mixgerät unter ständiger Kühlung zerkleinert. (Die Temperatur darf 20°C nicht übersteigen.) Zerkleinerte Haut mit Pufferflüssigkeit wieder zusammengeben und wiederum 48 h bei 4°C stehen gelassen. Danach gesamte Suspension 20 min bei ca 50.000 g in einer BHG-Kühlzentrifuge zentrifugiert. Überstand weiterverwendet, Bodensatz verworfen. Überstand mehrmals gegen NaCl/Na-Citrat (9:1) dialysiert, bis ein pH von 7,3 bis 7,4 erreicht ist. Nach Zugabe von wiederum 10 mg% Neomycinsulfat Lagerung der Ratten-Prokollagenlösung bei 0°C.

### Herstellung von Human-Prokollagen

Material: Dura mater und Tractus ileotibialis von Leichen unter 60 Jahren und Säuglingshaut. Vor dem Zerkleinern sorgfältiges Abpräparieren von Fettgewebe und Muskelgewebe. Sonstige Herstellung wie bei Ratten-Prokollagen - mit dem Unterschied, daß die Zerkleinerung im Starmixgerät weniger intensiv erfolgt und die anschließende, erneute Quellung in der Pufferflüssigkeit nur 24 h durchgeführt wird.

### Lösung der Hemm-Substanzen

Die Hemmsubstanzen lagen entweder in kristalliner Form oder bereits gelöst vor (z.B. die handelsüblichen Präparate zur i.v. oder i.m. Applikation). Die benutzten Lösungsmittel: NaCl/Na-Citrat (9:1); Äthyl-Alkohol/NaCl-Na-Citrat in verschiedenen Volumenverhältnissen und Äthylenglykol/NaCl-Na-Citrat ebenfalls in verschiedenen Volumenverhältnissen.

Vor Beginn der Hemmversuche mit den gelösten Substanzen wurde die Wirkung des Lösungsmittels auf die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation getestet. Die gewählten Lösungsmittel beeinflussen bis auf Äthylenglykol die Plättchenaggregation nicht. Bei Hemmstoffen, die in Äthylenglykol gelöst waren, wurde dem entsprechenden Leerwert ebenfalls Äthylenglykol in der gleichen Konzentration zugesetzt. Bei einer Verdünnung von 1:250 (0,01 ml gelöster Hemmstoff zu 2,5 ml PRP-Prokollagen Suspension zugesetzt) spielt aber selbst die Äthylenglykol-Hemmung eine geringe Rolle, weil sie sehr schwach ist.

In NaCl/Na-Citrat (9+1) wurde gelöst: Na-Salicylat, Silubin, cycl. AMP, ATP, AH 4986, Tween 80, Cremophor, Triton WR 1339, Harnstoff.

In Äthylalkohol/NaCl-Na-Citrat (1+1) wurde gelöst: Salicylsäure, Acethylsalicylsäure, Salicylamid, RG 221, RG 211, RG 223, RG 203, HE 275, Adenosin.

In Äthylalkohol/NaCl-Na-Citrat (6+4) wurde gelöst: RG 225, HE 284, HE 277.

In Äthylalkohol/NaCl-Na-Citrat (8+2) wurde gelöst: HE 162.

In Äthylenglykol/NaCl-Na-Citrat (4+3) wurde gelöst: RG 219, HE 279.

In Äthylenglykol/NaCl-Na-Citrat (7+3) wurde gelöst: RG 208, WP 50.

Die Präparate Persantin, Euphyllin, Megaphen, Dociton, Trasyolol, Heparin, Arterenol, Regitin, Novocain und Butazolidin entnahmen wir bereits gelöst den handelsüblichen Ampullen. Die verschlüsselten Präparate verdanken wir alle der Firma Boehringer GmbH, Mannheim.

#### Konzentrationsangaben:

Alle in dieser Arbeit aufgeführten Konzentrationen (M, mMol, g% und mg%) sind Endkonzentrationen.

### C. METHODE UND METHODENKRITIK

#### a) Methode

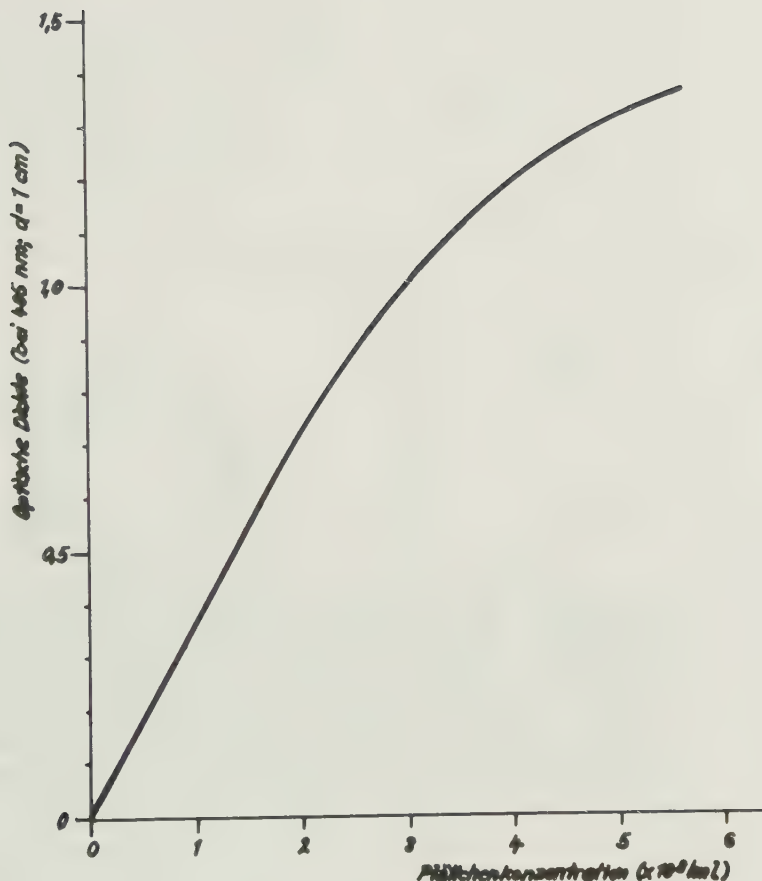
Zur Bestimmung der Kinetik der Thrombozytenaggregation wurde die von D. HEINRICH (21) beschriebene Methode benutzt. Diese Methode, die eine Modifikation der von BORN (4, 5) eingeführten lichtoptischen Messung der Thrombozytenaggregation darstellt, ermöglicht es, jede Phase der Thrombozytenaggregation der Desaggregation und der Hemmung der Aggregation zu verfolgen. Das Prinzip dieser Methode ist folgendes:

Jede Plättchensuspension erscheint schon makroskopisch gegenüber dem Suspensionsmittel trüb. Diese Trübung läßt sich photometrisch bestimmen. Solange die Plättchen nicht aggregieren, bleibt die optische Dichte konstant. Diese optische Dichte ist bis zu einer Thrombozytenkonzentration von  $2,5 \times 10^8$ /ml direkt proportional der Plättchenkonzentration. Die sich ergebende Abhängigkeit von Plättchenkonzentration und Extinktion der Plättchensuspension bei der Wellenlänge 405 nm ist aus der Abb. A zu entnehmen.

Diese Proportionalität zwischen optischer Dichte und Plättchenkonzentration gilt auch für Plättchen verschiedener Spender, wie schon BORN und CROSS (4) zeigen konnten. Eine Bestimmung der Plättchenkonzentration durch Messung der optischen Dichte der Plättchensuspension erscheint deshalb, insbesondere in Anbetracht der oft großen Fehlerbreite bei Bestimmung der Plättchenkonzentration in der Zählkammer, erlaubt.

Aggregieren Plättchen in einer bewegten Suspension, so kommt es zu einer Abnahme der optischen Dichte. BORN (5) und O'BRIEN (39) haben dieses Phänomen benutzt, um die Kinetik der Thrombozytenaggregation zu verfolgen. Beide Autoren messen aber mit den von ihnen beschriebenen Versuchsanordnungen immer einzeln suspendierte Plättchen und Plättchenaggregate nebeneinander.

Abb. A

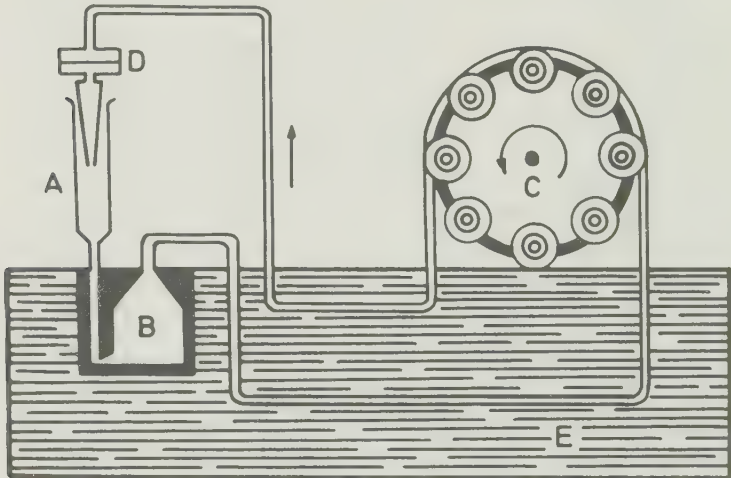


D. HEINRICH (21) pumpt die Plättchensuspension fortlaufend durch ein künstliches Kreislaufsystem, in dem sich eine Meßküvette und ein Filter befinden. Im Filter werden die Plättchenaggregate abgefangen, nicht aber die einzeln suspendierten Plättchen. Somit entspricht die gemessene optische Dichte in der Küvette immer der Anzahl nicht aggregierter Plättchen.

### Schema der Versuchsanordnung

|                      |                                                 |
|----------------------|-------------------------------------------------|
| (A) Einfüllrohr      | Volumen des Systems (ohne Einfüllrohr) : 2,4 ml |
| (B) Durchlaufküvette |                                                 |
| (C) Schlauchpumpe    |                                                 |
| (D) Filter           | Durchlaufgeschwindigkeit: 10 ml/min             |
| (E) Thermostat       |                                                 |

Abb. B



Die Versuchsanordnung bewährt sich besonders, wenn man zur Auslösung der Plättchenaggregation lösliches Kollagen verwendet. Hier kommt es bei dem von D. HEINRICH gewonnenen Kalbsprokollagen und dem von uns gewonnenen Rattenkollagen zur Polymerisation des Prokollagens bei Temperaturen über 25°C. Die auspolymerisierten Kollagenfasern stören, wenn sie in der Meßküvette verbleiben, die optische Messung der Thrombozytenaggregation. In der Methode nach D. HEINRICH werden die auspolymerisierten Kollagenfasern zusammen mit den Thrombozytenaggregaten im Filter abgefangen, so daß sich Störungen der Lichtstreuung vermeiden lassen.

Läßt man nun eine Plättchensuspension einer Normalperson im System zirkulieren, dann ergibt sich die in Abb. C wiedergegebene Kurve (a). Man erkennt, daß die Suspension im angegebenen Zeitraum stabil ist und eine konstante optische Dichte über 10 min gemessen wird.

Kommt es zur Aggregation der Plättchen, dann fällt die optische Dichte exponentiell ab (Abb. C (b)). Auf diese Weise läßt sich die Kinetik der Aggregation gut verfolgen. Es lassen sich die in Abb. C wiedergegebenen Parameter auswerten.

$E_0$  = Maß für die Plättchenausgangskonzentration

$E_1$  = Maß für die Anzahl nicht aggregierter Plättchen

$V_{\max}$  = Maß für die Aggregationsgeschwindigkeit =

$$\text{ctg } \alpha = \frac{E_a - E_b}{1} = \frac{\Delta E}{\text{min}}$$

$T_W$  = Maß für die Latenz der Reaktion = Zeit vom Start der Reaktion bis zum Wendepunkt W

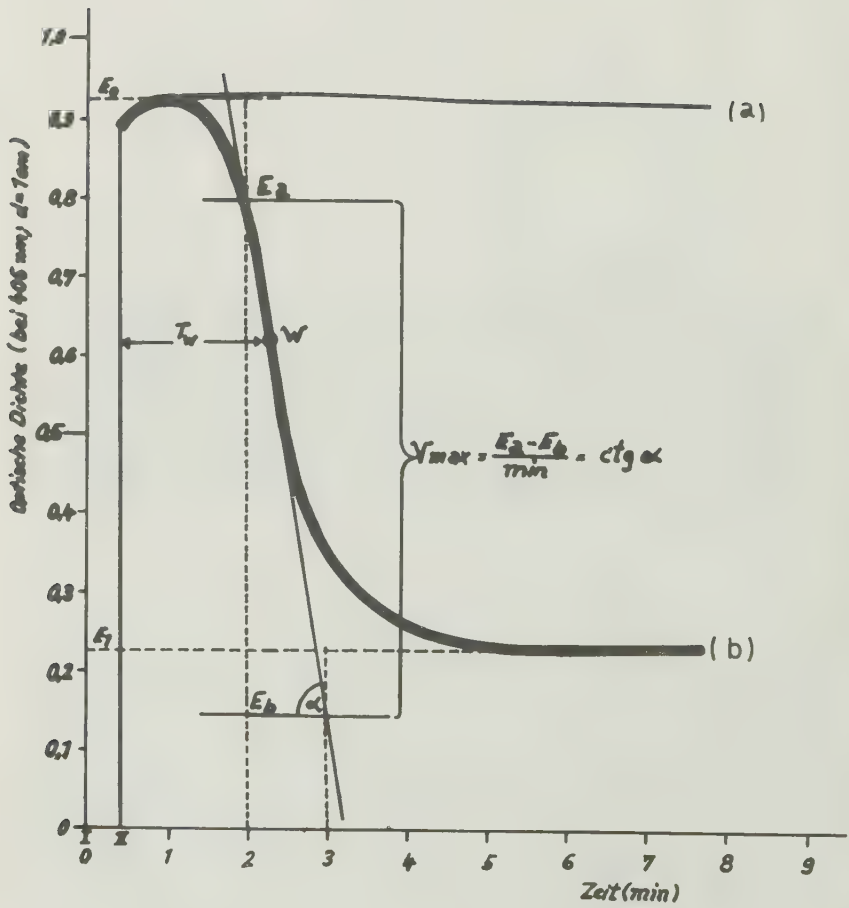
Mißt man die optische Dichte gegen einen plättchenfreien Ansatz, dann ist die Extinktion  $E_0$  proportional den in der Suspension enthaltenen Plättchen. Die insgesamt aggregierten Plättchen ergeben sich aus der Differenz  $E_0 - E_1$ .

$E_1$  entspricht dabei der Anzahl der nicht aggregierten Plättchen. Die Tangente an den Wendepunkt der Aggregationskurve in  $T_W$  ist ein Maß für die Geschwindigkeit ( $V_{\max}$ ), mit der die Plättchen aggregieren. D. HEINRICH (21) konnte zeigen, daß diese maximale Aggregationsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) von der Ausgangsmenge der Plättchen, dem Zustand des Plasmas, der Art und Menge der aggregationsauslösenden Substanz und insbesondere von dem Funktionszustand der Plättchen selbst abhängt.

$T_W$  ist ein Maß für die Latenzperiode, die bis zur Erreichung der maximalen Reaktionsgeschwindigkeit verstreicht.

Mittels dieser Parameter lassen sich neben der Aggregation der Plättchen auch die Desaggregation und die Hemmung der Plättchenaggregation verfolgen.

Abb. C



Versuchsansatz: a) 1,0 ml PRP  
b) 1,0 ml NaCl/Citrat (9:1)  
c) 0,5 ml Prokollagen in NaCl/Citrat  
d) 10-20  $\mu$ l Hemmstoff

Start des Versuchs: Gleichzeitige Zugabe von c) und d)  
zu a) und b) (ohne Inkubation)

### b) Methodenkritik

#### Fehlerbreite von Parallelversuchen:

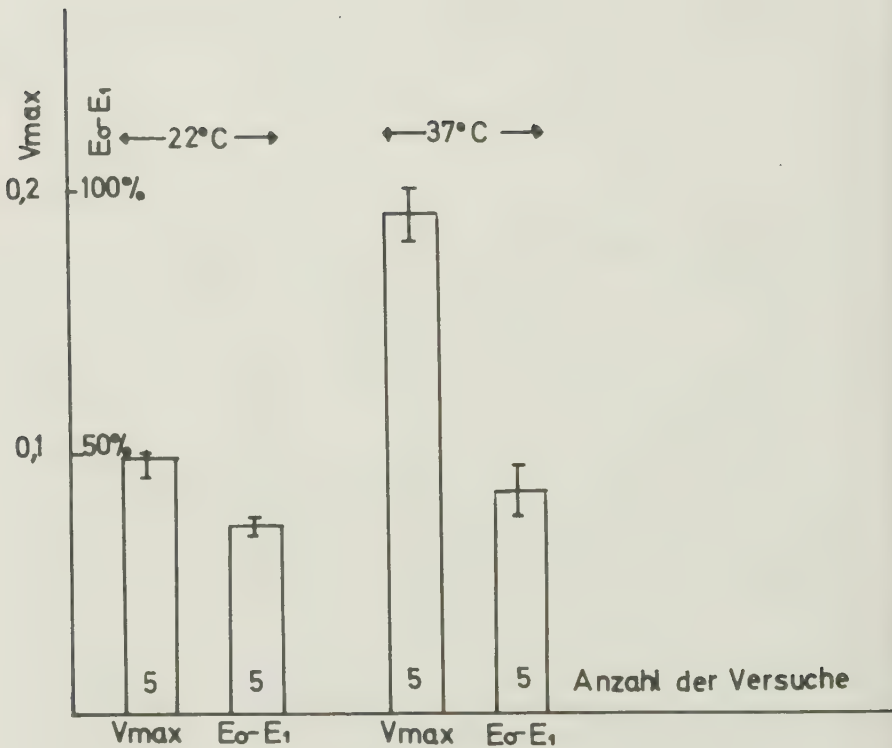
Für die von uns geplanten Untersuchungen der Hemmung der Thrombozytenaggregation war es wichtig zu wissen, wie groß die Fehlerbreite der Methode ist.

In Abb. D werden die Ergebnisse zusammengefaßt, die wir erhalten haben, indem wir dieselben Spenderthrombozyten bei 22°C und bei 37°C jeweils 5 mal hintereinander mit 12 mg% Human-Prokollagen im Testsystem aggregiert haben.

#### Ergebnis:

1. Die durchschnittliche Abweichung beträgt bei Bestimmung von  $V_{max}$  in beiden Temperaturbereichen  $\pm 5\%$ .
2. Die durchschnittliche Abweichung beträgt bei Bestimmung von  $E_0-E_1$  bei 22°C  $\pm 2\%$  - bei 37°C  $\pm 10\%$ .
3. Während die Anzahl aggregierter Plättchen mit 35% und 42% fast gleichbleiben, steigt mit Erhöhung der Temperatur von 22°C auf 37°C die Aggregationsgeschwindigkeit von 0,1 auf 0,19 um fast das Doppelte an.

Abb. D



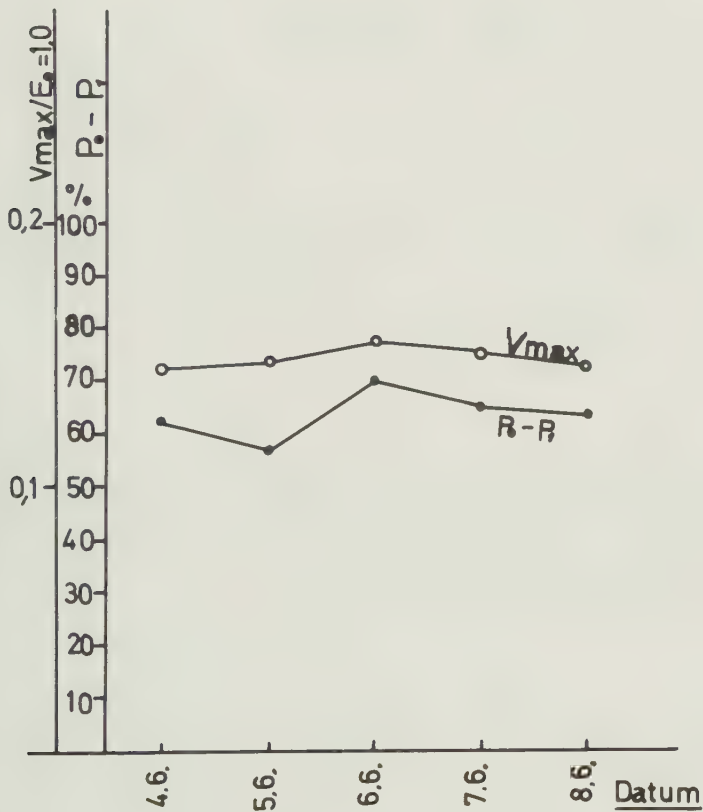
Konstanz der Thrombozytenaggregationsfähigkeit von Thrombozyten derselben Spender an verschiedenen Tagen:

Es interessierte nun weiterhin, ob Thrombozyten an verschiedenen Tagen die gleiche Aggregation nach Zusatz von Human-Prokollagen zeigen. Dies war insbesondere für die Untersuchung von plättchenaggregationshemmenden Substanzen in vivo von Bedeutung, denn eine Hemmung der Aggregationsfähigkeit der Plättchen nach Gabe von Pharmaka ist nur dann auszuwer-

ten, wenn die entsprechenden Kontrolluntersuchungen eine weitgehende Konstanz der Plättchenaggregation zeigen.

Die an 5 aufeinander folgenden Tagen entnommenen Thrombozyten zeigen nach Zusatz von 12 mg% Prokollagen in vitro das in Abb. E wiedergegebene Aggregationsverhalten.

Abb. E



Ergebnis:

Über 5 Tage bleibt das Aggregationsverhalten annähernd gleich, wobei die maximale Aggregationsgeschwindigkeit  $V_{\max}$  konstanter ist als die Zahl der aggregierten Plättchen ( $P_0 - P_1$ ).

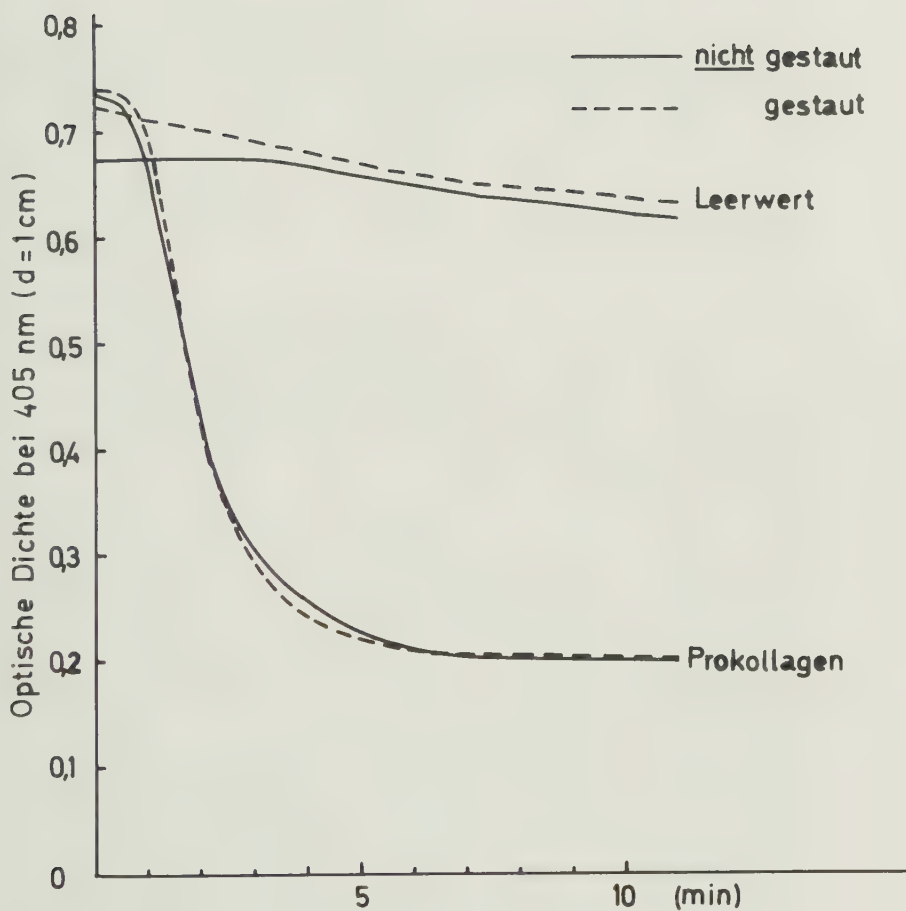
Einfluß des Stauens vor Blutentnahme:

Weiterhin wurde geprüft, ob die Art und Weise der Blutentnahme beim Patienten von Einfluß für die prokollageninduzierte Thrombozytenaggregation ist. Soweit irgend möglich, wurde die Cubitalvene mittels einer dicken Blutentnahmekanüle punktiert und das Blut in einer 20 ml-Plastikspritze aufgefangen. Inwieweit die Anstauung des Armes vor Entnahme des Blutes einen Einfluß auf die Prokollagen-induzierte Thrombozytenaggregation hat, zeigt Abb. F. Der Arm wurde vor der Blutentnahme 10 min gestaut.

Ergebnis:

Nach 10 min Anstauen des Armes ist eine geringgradige Aggregationssteigerung bei gleichbleibender Zahl aggregierender Plättchen zu verzeichnen. Für unsere Versuche ist diese Abweichung zu vernachlässigen, denn es wurde in keinem der Fälle derart lange gestaut.

Abb. F



## D. E R G E B N I S S E

### I. Plättchenaggregation

#### 1. Zusammenfassung aller durch HUMAN-Prokollagen induzierten Plättchenaggregationen mit Thrombozyten verschiedener Spender (Prokollagenkonz. 12 mg%)

Das von uns hergestellte HUMAN-Prokollagen induziert eine qualitativ gleiche Aggregation der Plättchen wie das von D. HEINRICH (21) hergestellte und beschriebene KALBS-Prokollagen.

Die Untersuchung von 22 Plättchenkonserven von 4 gesunden Spendern und von 18 Patienten, deren Diagnose und Anamnese keine Beeinflussung der Thrombozytenfunktion vermuten ließ, ergab einen Anhalt für das normale Aggregationsverhalten frischer, ungehemmter Thrombozyten nach Zusatz von 12 mg% HUMAN-Prokollagen in vitro.

Während die 22 Proben ein einheitliches Verhalten zeigten, war bei 3 weiteren Plättchenkonserven die Aggregationsgeschwindigkeit gesteigert und bei 4 Konserven die Aggregationsgeschwindigkeit verlangsamt. Die Konserven mit gesteigerter Plättchenaggregation stammen von 3 Patienten mit frischen Beinvenenthrombosen oder rezidivierenden thromboembolischen Ereignissen in der Anamnese.

Die Konserven mit verlangsamer Plättchenaggregationsgeschwindigkeit stammen von einer Patientin mit essentielltem Hypertonus, einer Patientin, die in den 6 Tagen vor der Blutentnahme zunächst 3 Tage mit Irgapyrin und dann 3 Tage mit Butazolidin behandelt worden war und einer Patientin, die wegen unklaren Schmerzen in den Beinen vor ihrer Einlieferung in die Klinik ebenfalls Schmerzmittel eingenommen hatte.

Die 22 Plättchenaggregationen mit Plättchen unauffälliger Spender, die 3 Konserven mit gesteigerter Plättchenaggregationsgeschwindigkeit und die 4 Konserven mit verlangsamer Plättchenaggregationsgeschwindigkeit sind in Tab. 1.1. zusammengestellt.

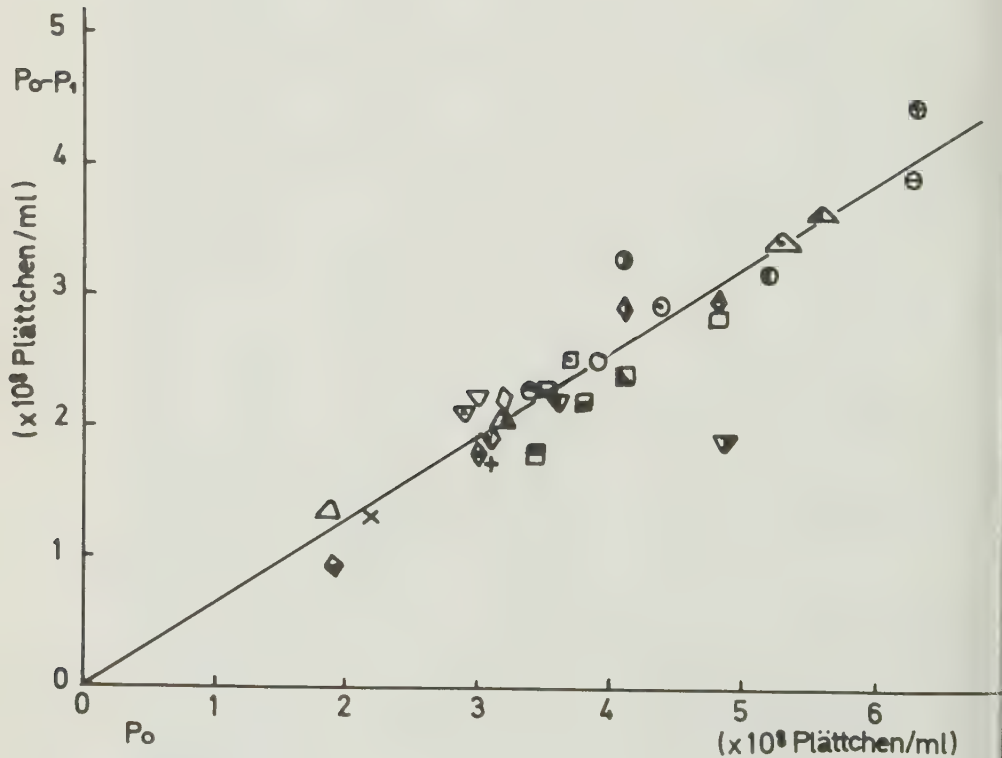
Tab. 1.1.: Zusammenstellung aller Prokollagen-induzierten Plättchenaggregationen mit PRP von gesunden Spendern und Patienten (Prokollagenkonz. 12 mg%)

| Nr. | Diagnose                            | Ausgangs-<br>plättch.-<br>Konz.<br>( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )<br>$P_0$ | Zahl der<br>aggr.<br>Plättch.<br>( $\times 10^6/\text{mm}^3$ )<br>$P_0 - P_1$ | $V_{\max}$ | Symbol |
|-----|-------------------------------------|---------------------------------------------------------------------------|-------------------------------------------------------------------------------|------------|--------|
| 1.  | gesund                              | 4,8                                                                       | 2,8                                                                           | 0.300      | (□)    |
| 2.  | RR ↑                                | 4,1                                                                       | 2,4                                                                           | 0.185      | (■)    |
| 3.  | gesund                              | 3,8                                                                       | 2,2                                                                           | 0.180      | (□)    |
| 4.  | RR ↑                                | 3,45                                                                      | 1,8                                                                           | 0.240      | (■)    |
| 5.  | unkl. BSG ↑                         | 3,2                                                                       | 2,2                                                                           | 0.290      | (◇)    |
| 6.  | Mult.Skler.                         | 1,9                                                                       | 0,95                                                                          | 0.080      | (◇)    |
| 7.  | RR ↑                                | 4,8                                                                       | 2,95                                                                          | 0.420      | (◇)    |
| 8.  | gesund                              | 3,05                                                                      | 1,9                                                                           | 0.175      | (◇)    |
| 9.  | unkl. BSG ↑                         | 4,1                                                                       | 2,9                                                                           | 0.390      | (◇)    |
| 10. | RR↑ Arth.def.                       | 3,9                                                                       | 2,5                                                                           | 0.250      | (○)    |
| 11. | RR↑ Arth.def.                       | 3,5                                                                       | 2,25                                                                          | 0.290      | (●)    |
| 12. | unkl. BSG ↑                         | 3,4                                                                       | 2,25                                                                          | 0.340      | (●)    |
| 13. | RR↑                                 | 5,2                                                                       | 3,15                                                                          | 0.285      | (●)    |
| 14. | unkl. BSG ↑                         | 4,4                                                                       | 2,9                                                                           | 0.270      | (●)    |
| 15. | unkl. BSG ↑                         | 3,7                                                                       | 2,5                                                                           | 0.290      | (□)    |
| 16. | unkl. BSG ↑                         | 3,0                                                                       | 1,8                                                                           | 0.250      | (◇)    |
| 17. | unkl. BSG ↑                         | 3,1                                                                       | 1,7                                                                           | 0.280      | (+)    |
| 18. | RR ↑                                | 5,6                                                                       | 3,6                                                                           | 0.430      | (△)    |
| 19. | Harnw.infekt                        | 3,2                                                                       | 2,05                                                                          | 0.290      | (△)    |
| 20. | unkl. BSG ↑                         | 3,6                                                                       | 2,2                                                                           | 0.220      | (▽)    |
| 21. | RR ↑                                | 5,3                                                                       | 3,4                                                                           | 0.430      | (△)    |
| 22. | gesund                              | 2,2                                                                       | 1,3                                                                           | 0.160      | (x)    |
| 23. | Beinv.Thrombose<br>Osteoporose      | 2,9                                                                       | 2,15                                                                          | 0.420      | (▽)    |
| 24. | Beinv.Thrombose<br>(frisch)         | 1,85                                                                      | 1,4                                                                           | 0.480      | (△)    |
| 25. | Rez.Thromboemb.<br>(antikoaguliert) | 3,0                                                                       | 2,2                                                                           | 0.600      | (▽)    |
| 26. | Essentielle<br>Hypertonie           | 6,3                                                                       | 3,85                                                                          | 0.205      | (⊖)    |
| 27. | "Ziehen" i.d.Beinen<br>unkl. BSG ↑  | 4,05                                                                      | 3,25                                                                          | 0.170      | (●)    |
| 28. | Essentielle<br>Hypertonie           | 6,3                                                                       | 4,4                                                                           | 0.220      | (⊕)    |
| 29. | RR↑ Arth.def.<br>+ Tanderil         | 4,85                                                                      | 1,85                                                                          | 0.190      | (▽)    |

1.1. Prozentuale Plättchenaggregation nach Zusatz von  
12 mg% HUMAN-Prokollagen

Stellt man sich nach Prokollagenzusatz die Zahl der aggregierenden Plättchen in Abhängigkeit von der Plättchenausgangskonzentration graphisch dar, dann ergibt sich die in Abb. 1.1. dargestellte Beziehung:

Abb. 1.1.



Ergebnis:

1. Es ergibt sich eine Durchschnittsplättchenaggregation von  $63 \pm 10\%$  nach Zusatz von 12 mg% HUMAN-Prokollagen.
2. Ein Wert fällt aus diesem Verhalten deutlich heraus. Die Plättchen stammen von der mit Irgapyrin und Butazolidin vorbehandelten Patientin.

1.2. Verhalten der Plättchenaggregationsgeschwindigkeit nach Zusatz von 12 mg% HUMAN-Prokollagen

Trägt man die maximale Aggregationsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) gegen die Plättchenausgangskonzentration ( $P_0$ ) auf, dann erhält man die in Abb. 1.2.1. wiedergegebene Beziehung. Die graphische Darstellung der Abhängigkeit der maximalen Aggregationsgeschwindigkeit von der Anzahl der insgesamt aggregierten Plättchen ( $P_0 - P_1$ ) ergibt Abb. 1.2.2.

Abb. 1.2.1.

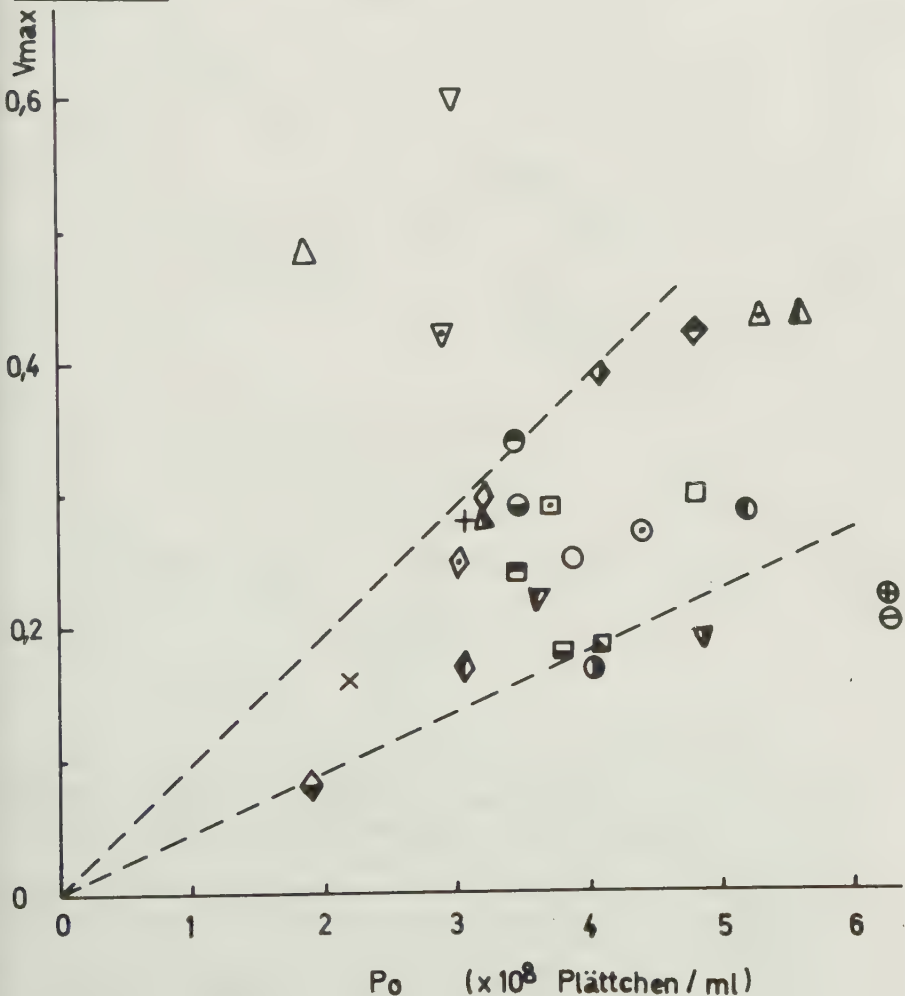
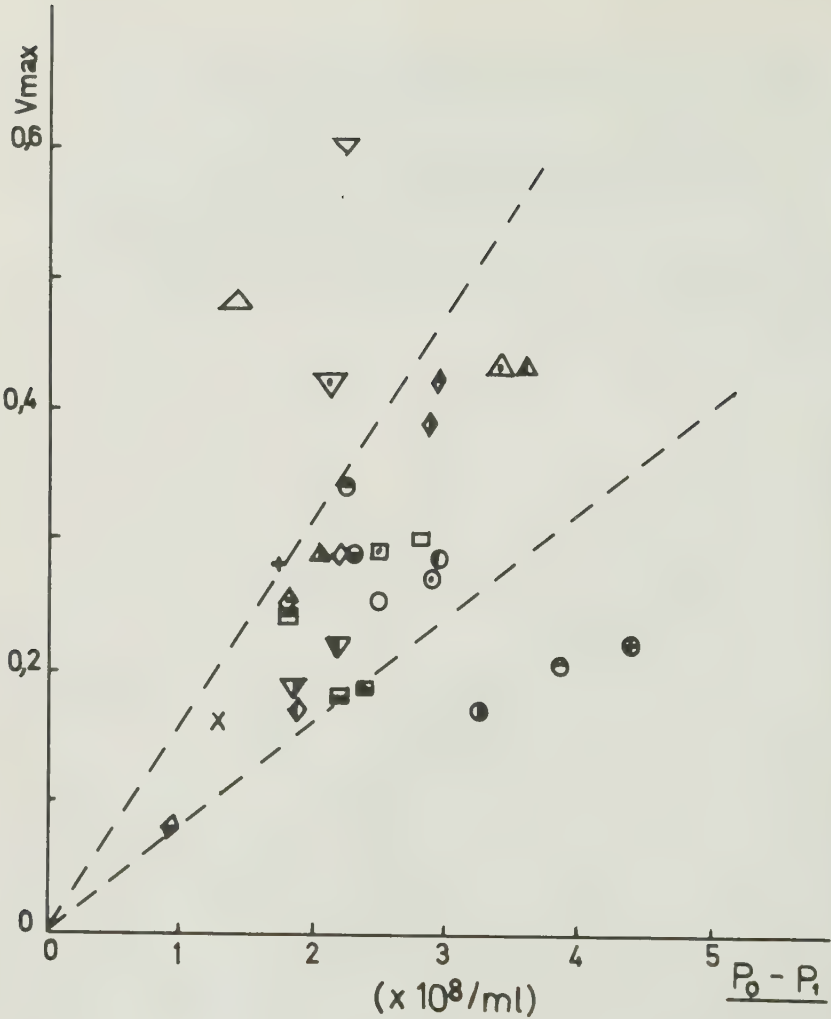


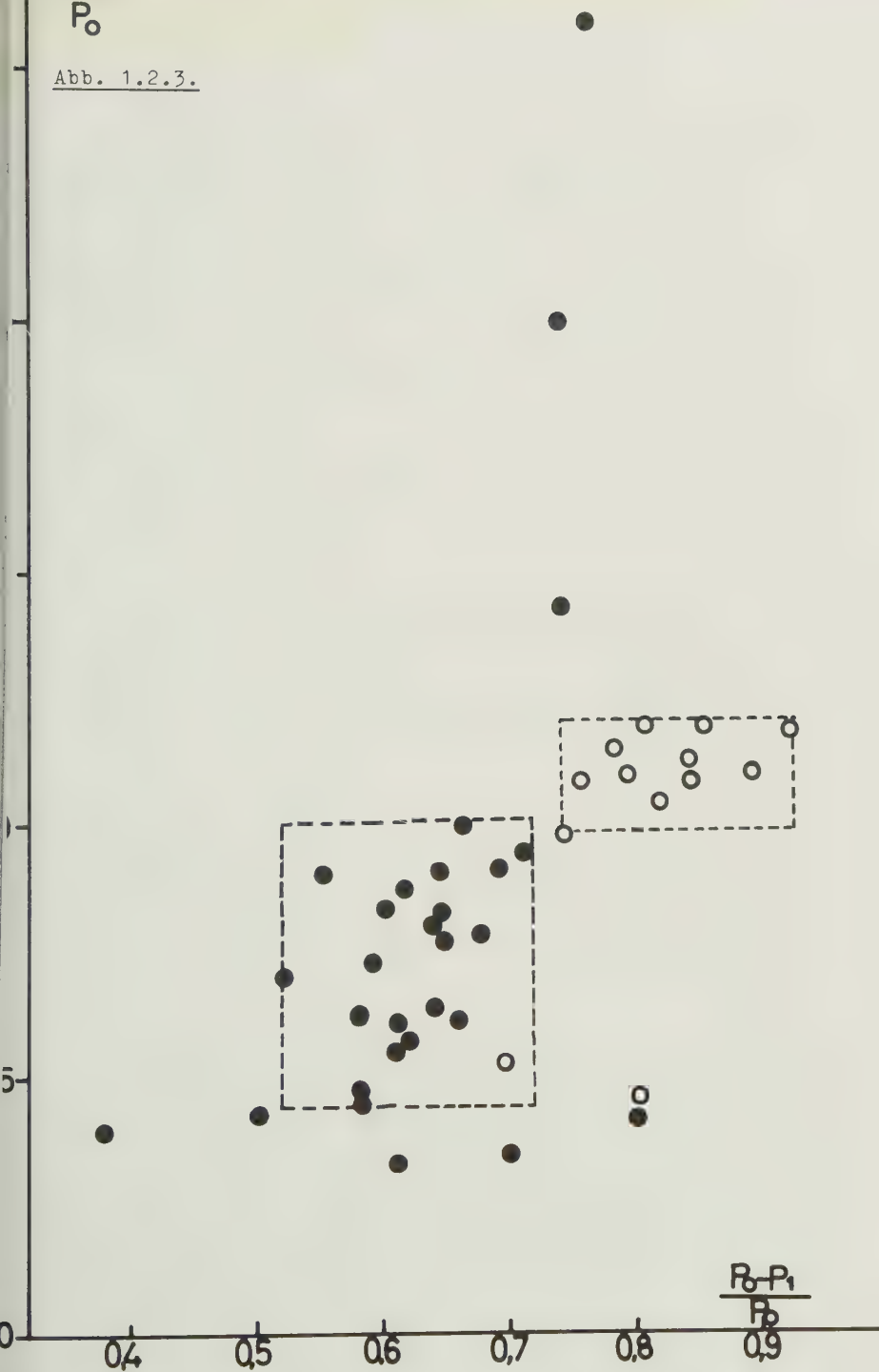
Abb. 1.2.2.



Die Abhängigkeit der relativen, auf die Ausgangskonzentration  $P_0$  bezogenen, maximalen Aggregationsgeschwindigkeit ( $V_{max}/P_0$ ) von der relativen Anzahl insgesamt aggregierter Plättchen ( $(P_0 - P_1)/P_0$ ) ist in Abb. 1.2.3. dargestellt (volle Kreise). Die leeren Kreise symbolisieren die von D. HEINRICH an Thrombozyten von Blutspendern gefundenen Ergebnisse nach Aggregation mit 40,5 mg HUMAN-Prokollagen.

$$\frac{V_{\max}}{P_0}$$

Abb. 1.2.3.



Ergebnis:

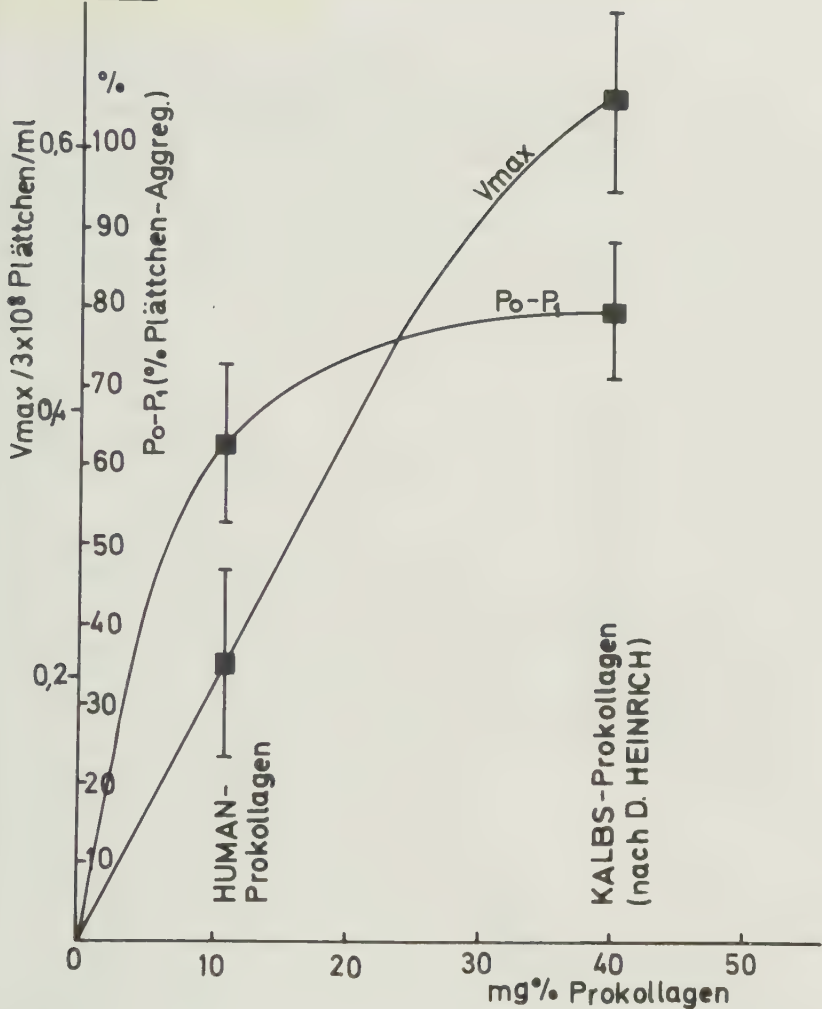
1. Trägt man die Plättchenaggregationsgeschwindigkeit  $V_{\max}$  einmal in Abhängigkeit von der Plättchenausgangskonzentration  $P_0$  und dann in Abhängigkeit von der Anzahl insgesamt aggregierter Plättchen auf, dann ergibt die graphische Darstellung keine strenge Beziehung. Die Werte der Plättchenaggregationen von 22 Normalpersonen streuen innerhalb der eingezeichneten Grenzen. Bei einer Plättchenausgangskonzentration von  $3 \times 10^8/\text{ml}$  errechnet sich ein  $V_{\max}$ -Mittelwert von 0,21. - Die Streuung beträgt  $\pm 33\%$ .
2. Die 3 Plättchenkonserven der Patienten mit thromboembolischen Komplikationen zeigen eine gegenüber der Norm um 100-190% gesteigerte Aggregationsgeschwindigkeit und unterscheiden sich somit deutlich vom Aggregationsverhalten normaler Plättchen.
3. Zur Beurteilung der Plättchenaggregationsfähigkeit erscheint die in Abb. 1.2.3. dargestellte Abhängigkeit von  $V_{\max}/P_0$  gegenüber  $P_0 - P_1/P_0$  am geeignetsten. Die Abweichungen der Normalwerte sind in dieser Darstellung geringer - die der pathologischen Thrombozytenaggregationen deutlicher.

Vergleicht man die Normalwerte der HUMAN-PROKOLLAGEN-induzierten Plättchenaggregation mit den von D. HEINRICH (21) mit KALB-Prokollagen erhaltenen Normalwerten, ergibt sich die in Tab. 1.2. und Abb. 1.2.4. wiedergegebene Beziehung.

Tab. 1.2.

| Prokollagen             | HUMAN  | KALB     |
|-------------------------|--------|----------|
| Eiweiß-Konzentration    | 12 mg% | 40,5 mg% |
| $V_{\max}$ -Mittelwert  | 0.21   | 0.64     |
| $P_0 - P_1$ -Mittelwert | 63%    | 80%      |

Abb. 1.2.4.



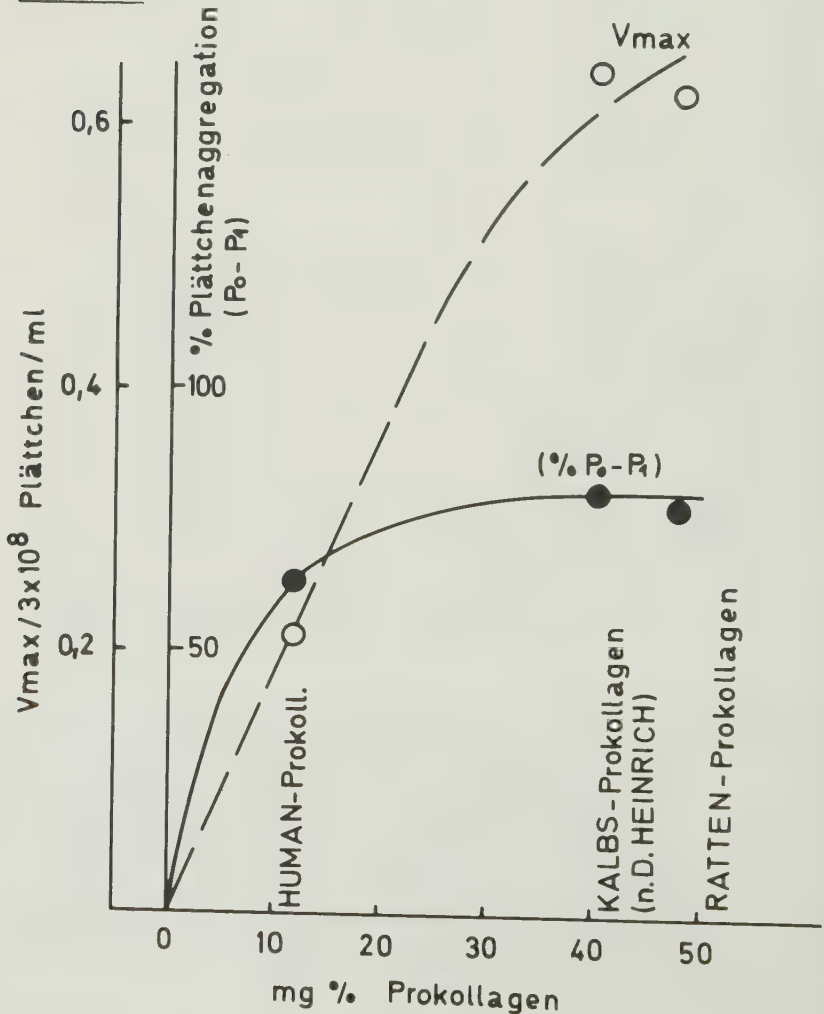
### Ergebnis:

Die Unterschiede zwischen dem von uns verwandten HUMAN-Prokollagen und dem von D. HEINRICH untersuchten KALBS-Prokollagen in bezug auf die Aggregation von Human-Thrombozyten erklären sich durch den geringeren Eiweißgehalt der Human-Prokollagenlösung. Der aggregationsauslösende Effekt von Kalbs-Prokollagen auf Human-Thrombozyten entspricht nach Untersuchungen von D. HEINRICH (21) vollkommen dem von Human-Kollagen, wenn man Kalbs-Prokollagen ebenfalls in einer Endkonzentration von 12 mg% in den Testansatz gibt.

## 2. Vergleich der Plättchenaggregationen ausgelöst durch HUMAN-, RATTEN- und KALBS-Prokollagen

Aus dem im vorigen Kapitel Gezeigten kann man schließen, daß Kalbs- und Human-Prokollagen keine artspezifischen Unterschiede in bezug auf die Aggregation von Human-Thrombozyten aufweisen. Für Rattenkollagen gilt dasselbe, wie aus Abb. 2.1. zu entnehmen ist.

Abb. 2.1.



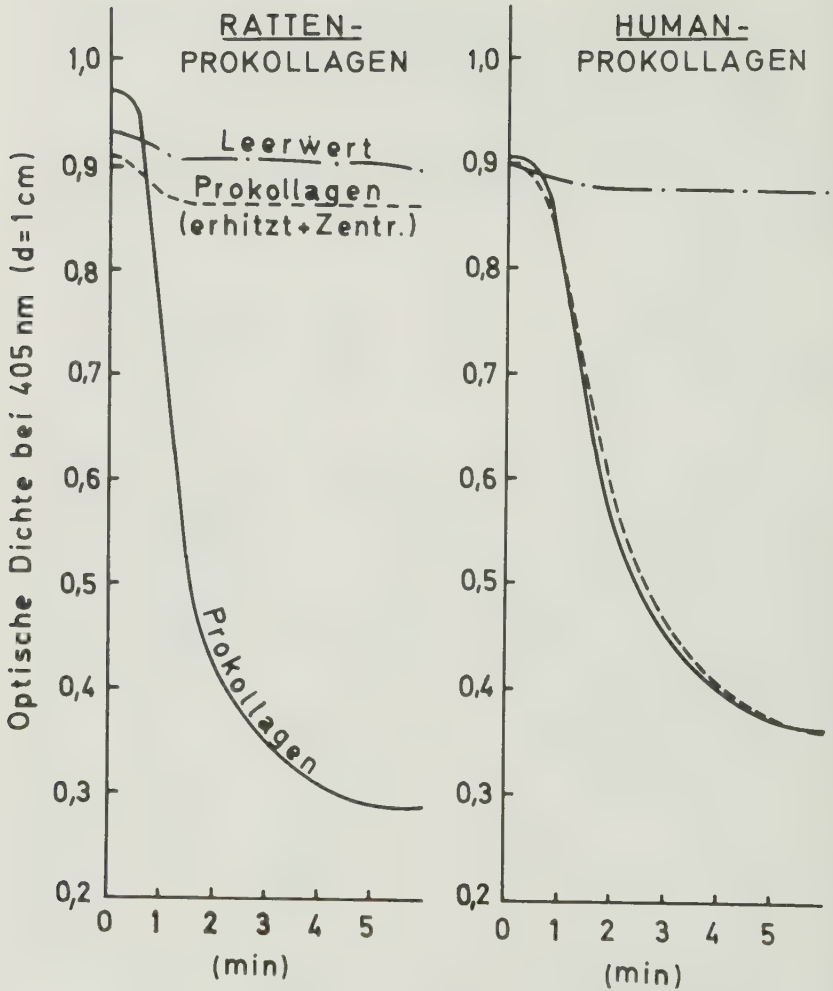
Das von D. HEINRICH (21) untersuchte KALBS-Prokollagen polymerisiert bei Temperaturen über 25°C. Nach Abzentrifugieren des polymerisierten Kollagens hat der Überstand keine plättchenaggregierende Wirkung mehr.

Wir haben dies für Ratten- und HUMAN-Prokollagen nachuntersucht, indem wir die Prokollagenlösungen bei 37°C 30 min inkubiert und anschließend 10 min mit ca. 10.000 g zentrifugiert haben. Die Eiweißkonzentration der Prokollagenlösungen nahm dadurch wie folgt ab:

| Eiweißgehalt       | vor     | nach Erhitzen + Zentrifug. |
|--------------------|---------|----------------------------|
| RATTEN-Prokollagen | 238 mg% | 3 mg%                      |
| HUMAN-Prokollagen  | 60 mg%  | 50 mg%                     |

Vergleicht man die plättchenaggregierende Aktivität der beiden Prokollagenlösungen vor und nach Inkubation bei 37°C, dann sieht man, daß der Überstand der Ratten-Prokollagenlösung nach Inkubation entsprechend der fast 100%igen Polymerisation keine aggregierende Aktivität auf Human-Thrombozyten mehr zeigt, während die HUMAN-Prokollagenlösung weder sichtbar auspolymerisiert noch ihre plättchenaggregierende Aktivität einbüßt (vergl. Abb. 2.2.).

Abb. 2.2.

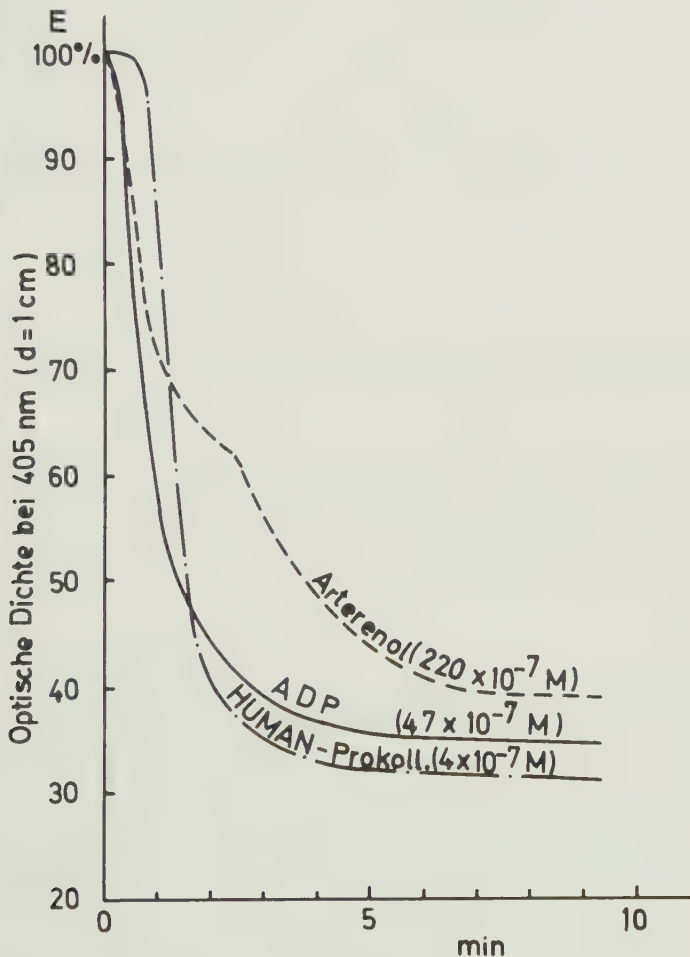


Ratten- und Human-Prokollagen-induzierte Aggregation von Human-Thrombozyten. Die Prokollagenlösungen wurden vor (—) und nach (---) Inkubation (30 min bei 37°C) und anschließender Zentrifugation (10 min bei 10.000 g) zu plättchenreichem Plasma desselben Spenders zugesetzt.

### 3. Vergleich der ADP-, Arterenol- und Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation

Vergleicht man die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation mit der ADP- und Arterenol-induzierten Plättchenaggregation, dann ergeben sich die in Abb. 3.1. wiedergegebenen Beziehungen.

Abb. 3.1.



Ergebnis:

1. Man erkennt, daß sowohl ADP als auch Arterenol ohne Latenzperiode eine Plättchenaggregation auslösen. Die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation beginnt erst nach einer Verzögerung von 30-50 sec.
2. In allen 3 Fällen erreicht die Plättchenaggregation ungefähr das gleiche Plateau, d.h. es bleiben eine annähernd konstante Anzahl nicht aggregierte Plättchen zurück.
3. Bezogen auf das Molekulargewicht hat Prokollagen die stärkste aggregationsauslösende Wirkung.
4. Die Arterenol-induzierte Plättchenaggregation läuft in 2 Phasen ab. Mit ADP und Prokollagen konnten wir das nicht beobachten.

4. Abhängigkeit der Plättchenaggregation von der Prokollagenkonzentration

Um die Abhängigkeit der Plättchenaggregation von der Menge des zugesetzten Human-Prokollagen zu untersuchen, haben wir zu 8 h alten Human-Plättchen steigende Mengen Prokollagen zugesetzt. Die resultierenden Aggregationskurven sind in Abb. 4.1. zusammengestellt.

Ergebnis:

Man erkennt deutlich, daß mit steigender Prokollagenkonzentration sowohl die insgesamt aggregierenden Plättchen ( $P_0 - P_1$ ) als auch die maximale Aggregationsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) zunehmen.

Abb. 4.1.

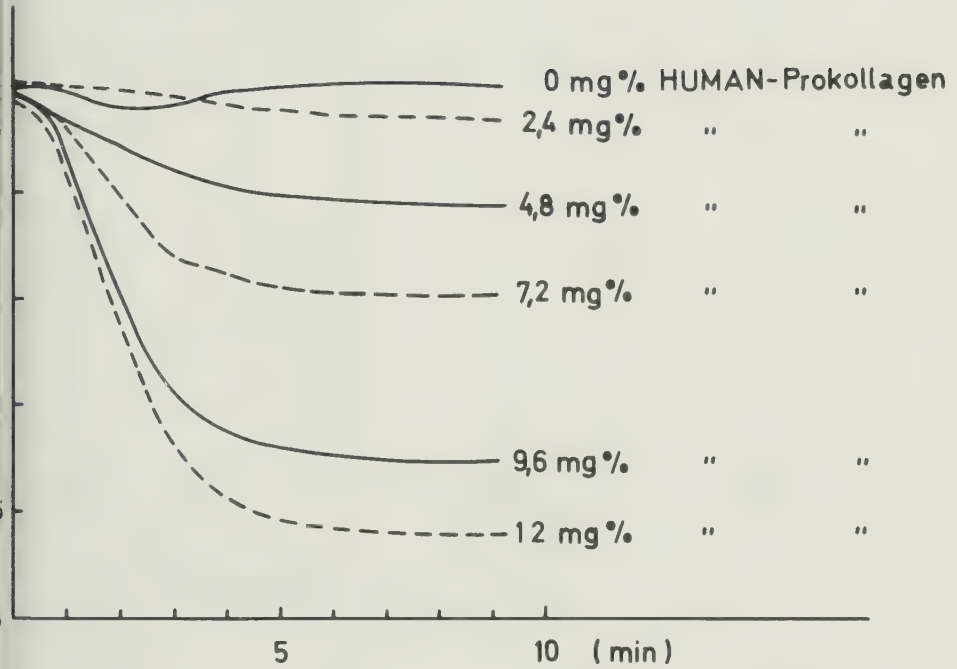
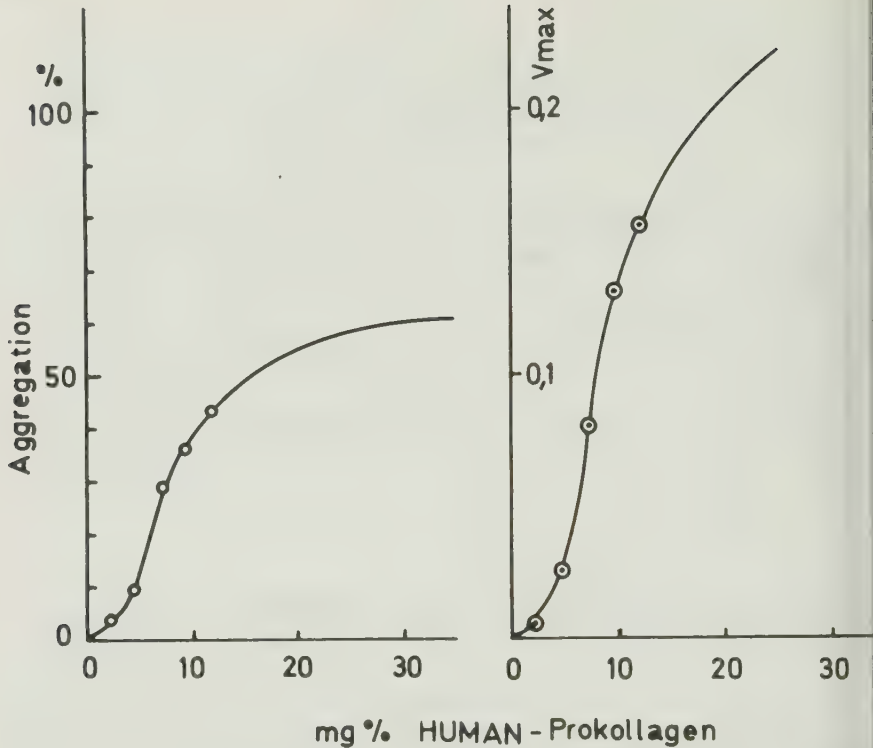


Abb. 4.2. zeigt noch einmal in graphischer Darstellung  $P_0-P_1$  und  $V_{max}$  in Abhängigkeit von der Prokollagenkonzentration.

Abb. 4.2.



Ergebnis:

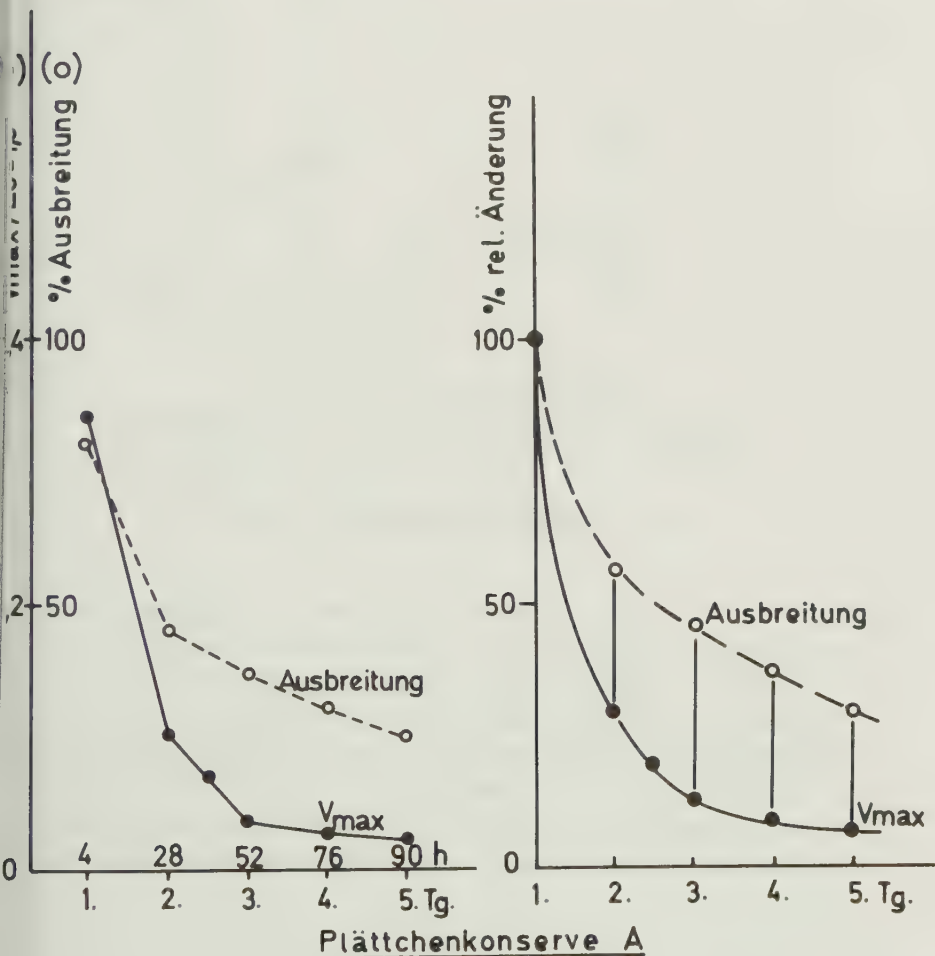
Man sieht, daß beide Kurven einem Grenzwert zustreben. Der Grenzwert liegt für die %-Plättchenanzahl, die maximal aggregiert, bei ca. 60%.

5. Abhängigkeit der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation vom Plättchenalter

BREDDIN (10) konnte mit der von ihm beschriebenen Methode der Plättchenausbreitung zeigen, daß Plättchen in vitro sehr schnell ihre Ausbreitungsfähigkeit verlieren. Daraus folgte BREDDIN einen Funktionsverlust der Thrombozyten, welcher mit keiner anderen klinischen Methode empfindlicher nachzuweisen sei.

D. HEINRICH (21) konnte bei seinen Untersuchungen der Plättchenaggregation mit Kalbs-Prokollagen ebenfalls einen Parameter -  $V_{max}$  - aufzeigen, der die Thrombozytenfunktion empfindlich mißt. Vergleicht man einmal beide Methoden miteinander, indem man bei einer Plättchenkonserve sowohl die Ausbreitung als auch die Aggregation mit Prokollagen (12 mg%) bestimmt, dann bekommt man folgende Ergebnisse:

Abb. 5.1.

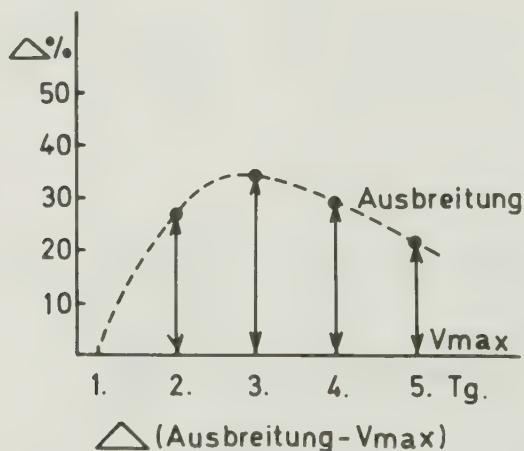


Ergebnis (Abb. 5.1.):

Man registriert mit beiden Methoden einen deutlichen Abfall der Thrombozytenfunktion in den ersten 2-3 Tagen, wobei Vmax steiler und schneller abfällt als die %-Ausbreitung.

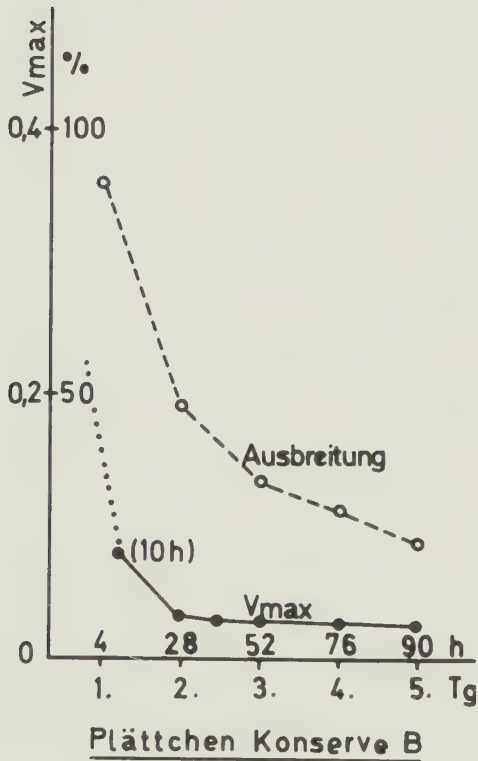
Die rel. Differenz der Werte beider Methoden ist am 2.-3. Tag am größten, wie aus Abb. 5.2. hervorgeht.

Abb. 5.2.



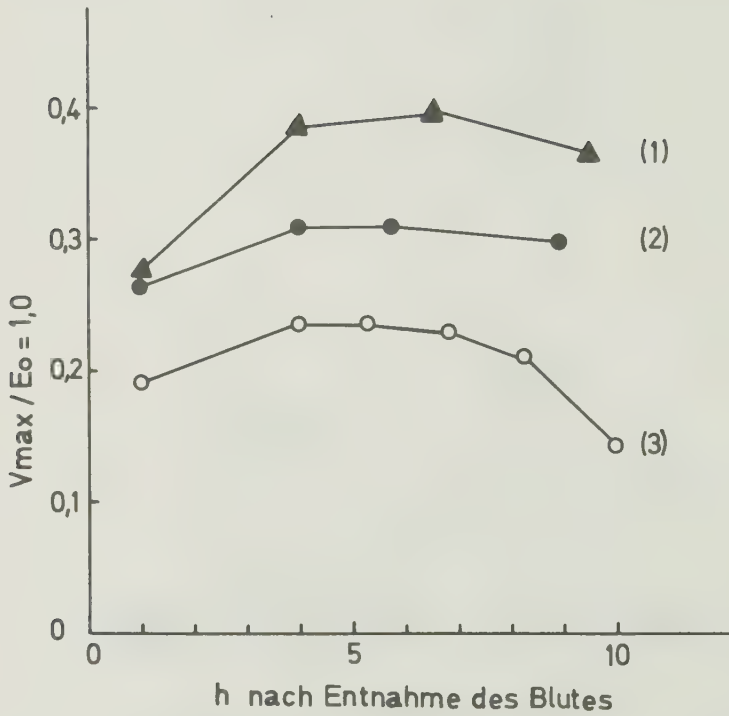
Eine Plättchenkonserve (Konserve B), bei der wir ebenfalls die Abnahme der Plättchenaggregationsgeschwindigkeit mit der Abnahme der Ausbreitung vergleichen wollten, zeigte bereits 10 h nach Blutentnahme eine deutlich reduzierte Aggregationsgeschwindigkeit, während die Ausbreitung (4 h nach Blutentnahme noch ausgezeichnet war (vergl. Abb. 5.3.)). Es wurde angenommen, daß dafür eine in den ersten 10 h nach Blutentnahme eingetretene Plättchenfunktionsschädigung verantwortlich ist.

Abb. 5.3.



Dies hat uns veranlaßt, zu prüfen, wie sich bei 3 verschiedenen Plättchenkonserven Vmax in den ersten Stunden nach Blutentnahme verhält. In Abb. 5.4. sind die Ergebnisse wiedergegeben.

Abb. 5.4.



Ergebnis:

1. Man sieht zunächst bei allen 3 Plättchenkonserven nach Zusatz von Prokollagen einen deutlichen Anstieg der Plättchenaggregationsgeschwindigkeit ( $V_{\max}$ ) in den ersten 4 Stunden.
2. Nach 7-8 Std. fällt  $V_{\max}$  wieder ab. In der Konserve (3) ist dieser Abfall nach 10 Std. bereits sehr deutlich.

## 6. Abhängigkeit der Plättchenaggregation von der Beschaffenheit des Prokollagens

### 6.1. Vorinkubation des Prokollagens bei verschiedenen Temperaturen

Im Abschnitt 2 konnten wir zeigen, daß das HUMAN-Prokollagen im Gegensatz zum RATTEN- und KALES-Prokollagen nach 30 min Inkubation bei 37°C so gut wie keine abzentrifugierbaren Polymerisate bildet und daß die Inkubation die plättchenaggregierende Wirkung nicht verändert. Eine Polymerisation erfolgt auch nicht bei höheren Temperaturen. D. HEINRICH (21) konnte am KALBS-Prokollagen zeigen, daß die Inkubation des Prokollagens im Wasserbad bei Temperaturen über 54°C eine Denaturierung des Eiweißes bedingt, so daß sowohl die Fähigkeit zu polymerisieren als auch die Fähigkeit, Plättchen zu aggregieren, verloren geht.

Es war deshalb von Interesse zu untersuchen, ob diese Denaturierung bei Temperaturen über 54°C auch bei dem von uns benutzten HUMAN-Prokollagen stattfindet. Wir inkubierten zu diesem Zweck HUMAN-Prokollagen 30 min in einem Wasserbad bei steigenden Temperaturen. Nach Abkühlen der Prokollagenlösungen wurde ihre plättchenaggregierende Wirkung bei 37°C untersucht. Die Ergebnisse sind in Abb. 6.1.1. und Abb. 6.1.2. zusammengestellt.

#### Ergebnis:

1. Erst bei 30 min Inkubation über 80°C verliert die HUMAN-Prokollagenlösung ihre plättchenaggregierende Eigenschaft.
2. Selbst nach 30 min Inkubation bei 100°C ist noch eine deutliche Restaktivität der Prokollagenlösung zu sehen.
3. Eine sichtbare Polymerisation der HUMAN-Prokollagenlösung trat in keinem Fall ein. Es bestätigt sich die von D. HEINRICH an Pepsin-angedautem Prokollagen gemachte Beobachtung, daß die Fähigkeit der Prokollagenlösung, zu polymerisieren, nicht mit der Fähigkeit, Plättchen zu aggregieren, gekoppelt ist.

Abb. 6.1.1.

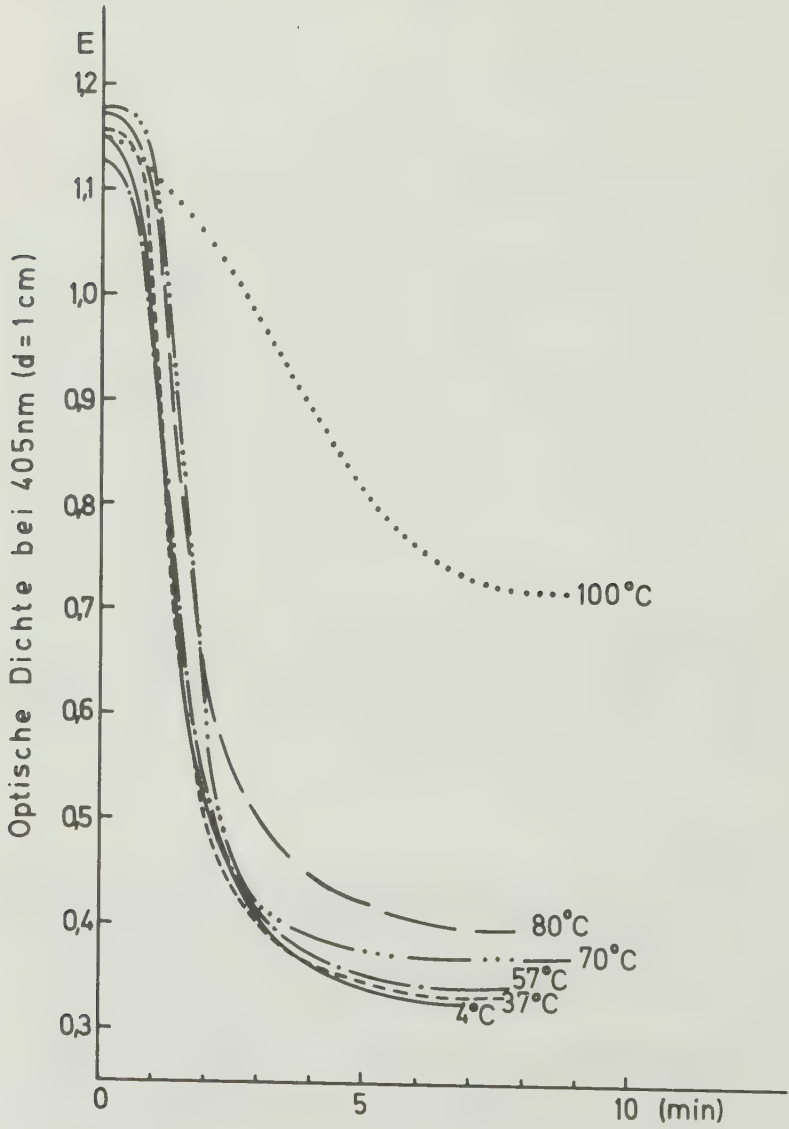
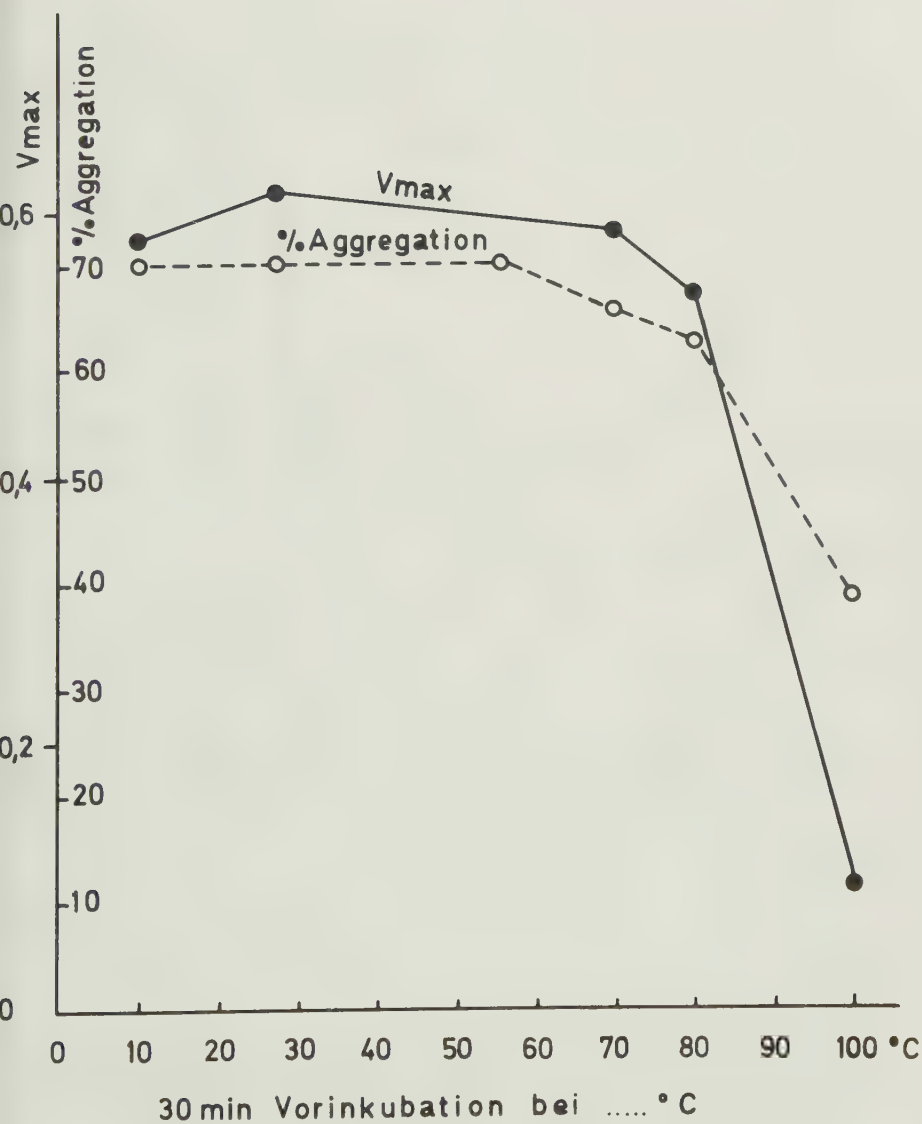


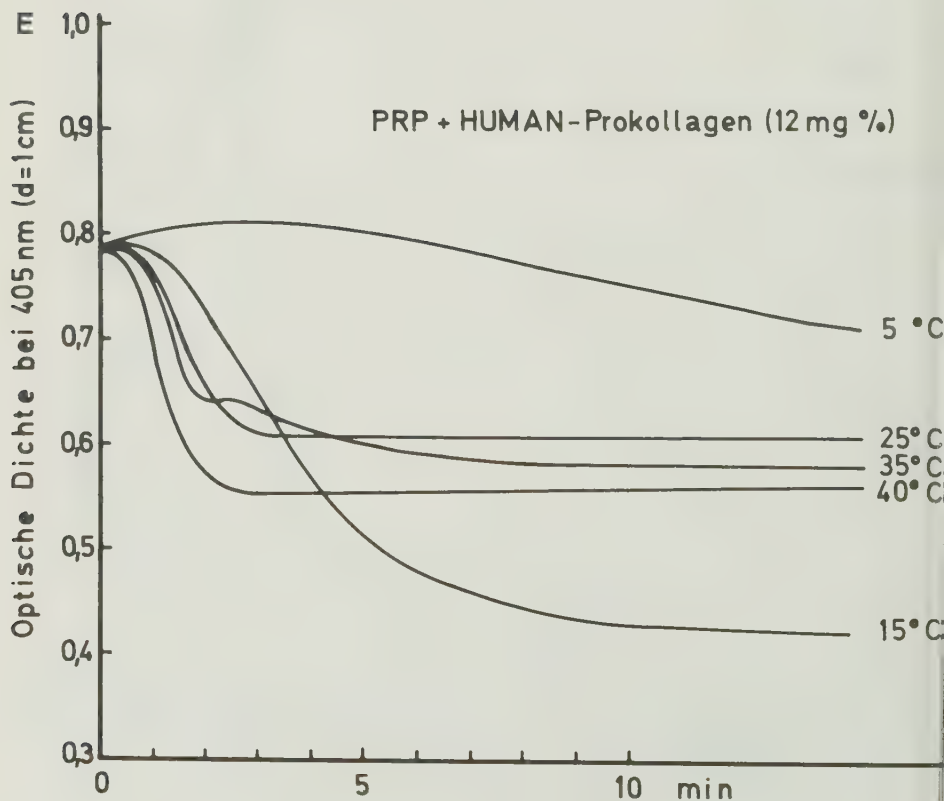
Abb. 6.1.2.



### 7. Abhängigkeit der Prokollagen-induzierten Plättchen- aggregation von der Temperatur

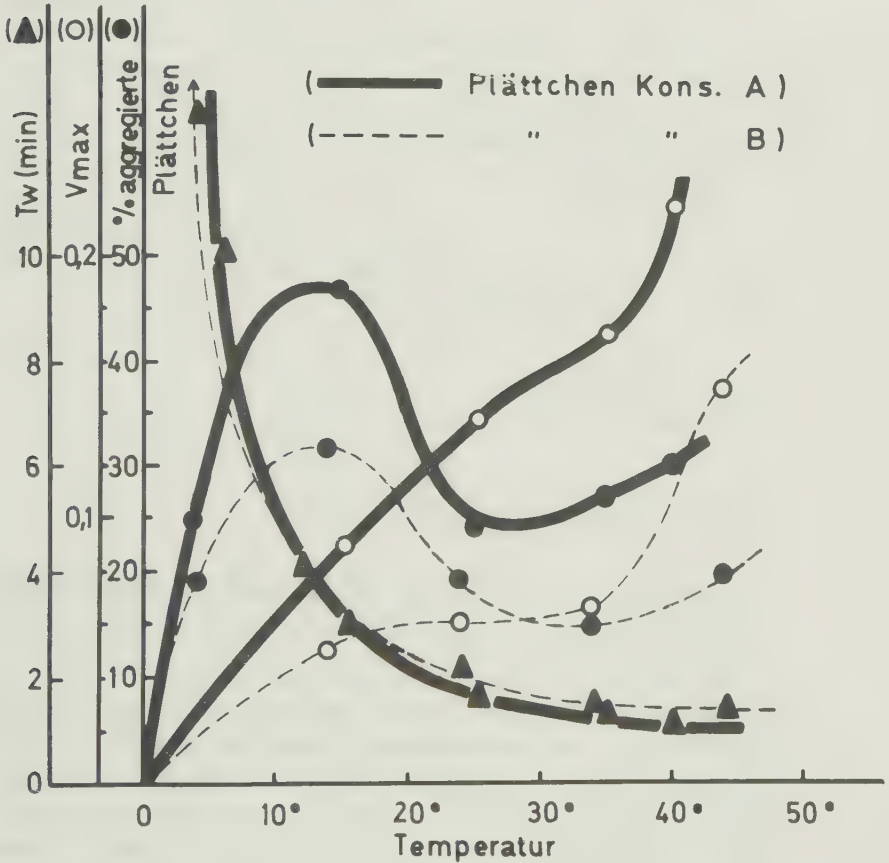
In Abb. 7.1. sind die Extinktionskurven aufgezeichnet, die wir erhalten haben, wenn Plättchen einer Konserve (A) bei jeweils veränderter Temperatur mit HUMAN-Prokollagen (12 mg%) aggregiert wurden.

Abb. 7.1.



In Abb. 7.2. sind die Parameter  $V_{\max}$ ,  $T_W$  und  $E_0-E_1$  von 2 Konserven (A) und (B) nach Prokollagenzusatz zusammengefaßt.

Abb. 7.2.



Ergebnis:

1.  $V_{\max}$  steigt mit ansteigender Temperatur an, während  $T_W$  abnimmt.
2. Bei 12-15°C aggregieren die meisten Plättchen. Zwischen 20 und 35°C wird die Aggregation trotz steigender Aggregationsgeschwindigkeit vorzeitig abgebrochen. Im Bereich

zwischen 35 und 44°C steigt die Anzahl insgesamt aggregierter Plättchen wieder etwas an.

3. Der 2-phasische Abfall der Extinktionskurve bei 35°C in Abb. 7.1. wurde von uns sonst nie beobachtet.

Die gemessenen Parameter  $V_{\max}$ ,  $T_W$  und  $E_0-E_1$  ergeben sich als Resultante des Zusammenwirkens vieler Faktoren, die alle für sich temperaturabhängig sind. Da wir zeigen konnten, daß eine Steigerung der Temperatur bis 80°C keinen Einfluß auf die plättchenaggregierende Wirkung des HUMAN-Prokollagens hat, kann man annehmen, daß die Veränderung der Versuchstemperatur von 5°C auf 44°C keinen Einfluß auf das Kollagenmolekül hat - somit das Prokollagen als Konstante in die Reaktion eingeht.

## II. Hemmung der Plättchenaggregation

### 8. Gesamtübersicht aller auf die Hemmung der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation hin untersuchten Substanzen

Aus der Literatur ist bekannt, daß eine ganze Reihe von Substanzen die Aggregationsfähigkeit von Thrombozyten hemmt.

Während diese Hemmung meist an Hand der ADP-induzierten Thrombozytenaggregation gezeigt wird, soll in unseren Experimenten geprüft werden, welchen Einfluß die verschiedensten Pharmaka auf die durch Human-Prokollagen hervorgerufene Plättchenaggregation haben.

Dabei interessieren vor allem Salizylsäure, Adenosin und deren Derivate. Ferner war von Interesse, wie Substanzen, die in der Klinik zur Prophylaxe bzw. Therapie von Thrombosen angewandt werden, die Human-Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation beeinflussen (z.B. Liquemin, Trasylol, Marcumar, Phenylbutazon).

Alle Substanzen haben wir in vitro geprüft. Von allen Substanzen wurden Dosis-Wirkungs-Beziehungen aufgestellt und jeweils die %-Hemmung der Plättchenaggregationsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) registriert, die die Hemmsubstanz in einer  $2 \times 10^{-4} M$  Endkonzentration hat.

Es zeigte sich im Verlaufe der Versuchsreihe, daß die Dosis-Wirkungs-Kurven von Patient zu Patient sehr verschieden sein können. Da wir nicht jede Substanz in genügend hoher Zahl getestet haben, um Mittelwerte anzugeben, haben wir die jeweils stärkste Hemmung in der Tab. 8.1. berücksichtigt.

Ansatz: a) 1,0 ml PRP

b) 1,0 ml NaCl/Citrat (9+1)

c) 0,5 ml Prokollagen in NaCl/Citrat

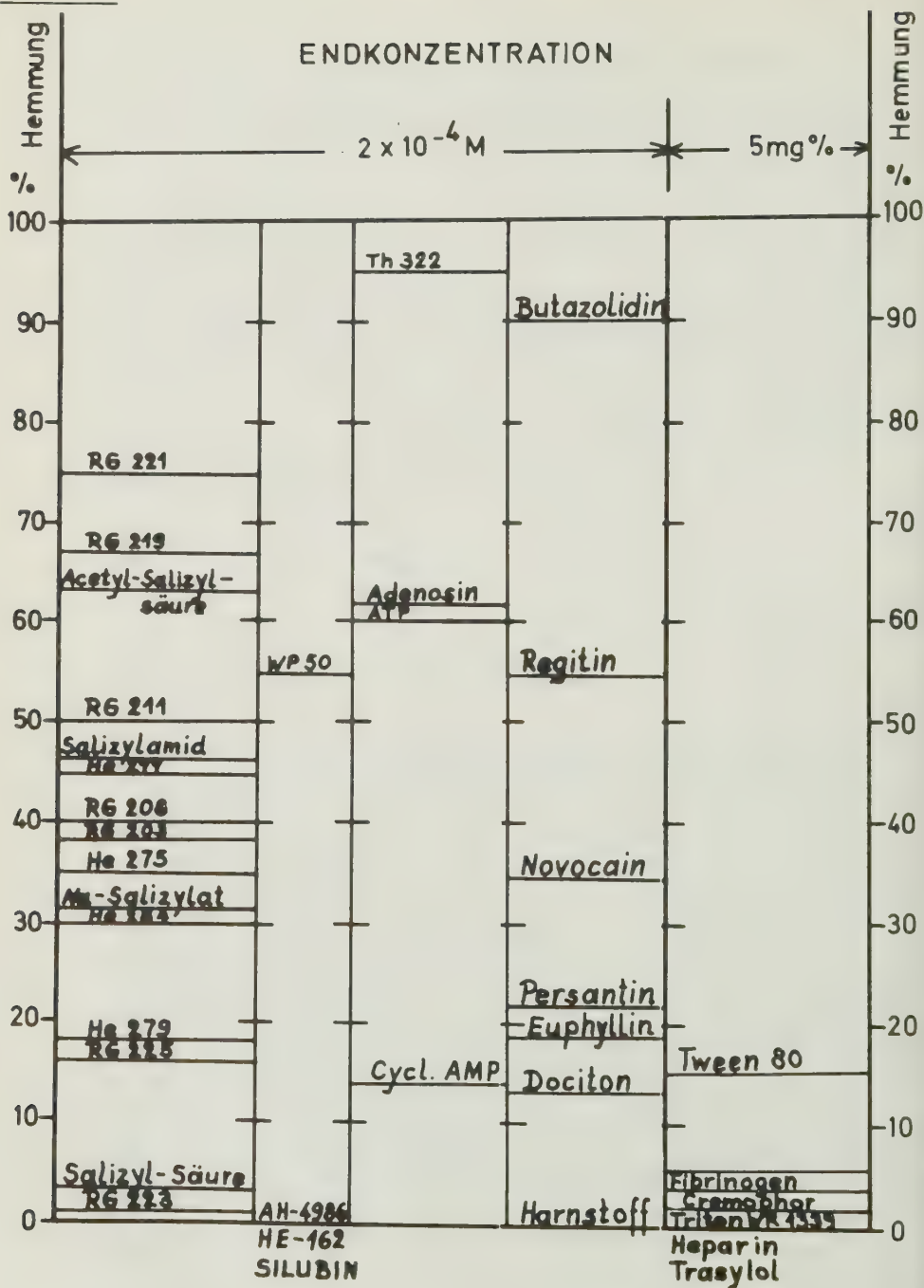
d) 10-20  $\mu$ l Hemmstoff (in NaCl/Citrat)

( a) + b) zunächst in Ansatzrohr A (vergl. S. 9) gefüllt; Reaktion unter gleichzeitigem Zusetzen von c) + d) gestartet).

### 8.1. Gruppe der wirksamsten Hemmstoffe

Die Dosis-Wirkungskurven der wirksamsten Hemmstoffe sind in Abb. 8.1. wiedergegeben. Dabei zeigt sich, daß Th 322, ein Adenosin-Körper, allen wirksamen Hemmstoffen deutlich überlegen ist. Bei einer Konzentration von  $2 \times 10^{-5} M$  ist bereits die maximale Hemmung erreicht. Als zweitstärkster Hemmstoff erscheint das in der Klinik seit langem bekannte Phenylbutazon (Butazolidin). Es hat einen deutlich stärkeren Effekt auf die Hemmung der Thrombozytenaggregation als Aspirin. RG 221, ebenfalls ein Salicylsäure-Derivat, liegt mit seiner hemmenden Wirkung zwischen Aspirin und Butazolidin. Es ist bis zu einer Konzentration von  $2 \times 10^{-5} M$  so wirksam wie Butazolidin. Mit zunehmender Konzentration steigt

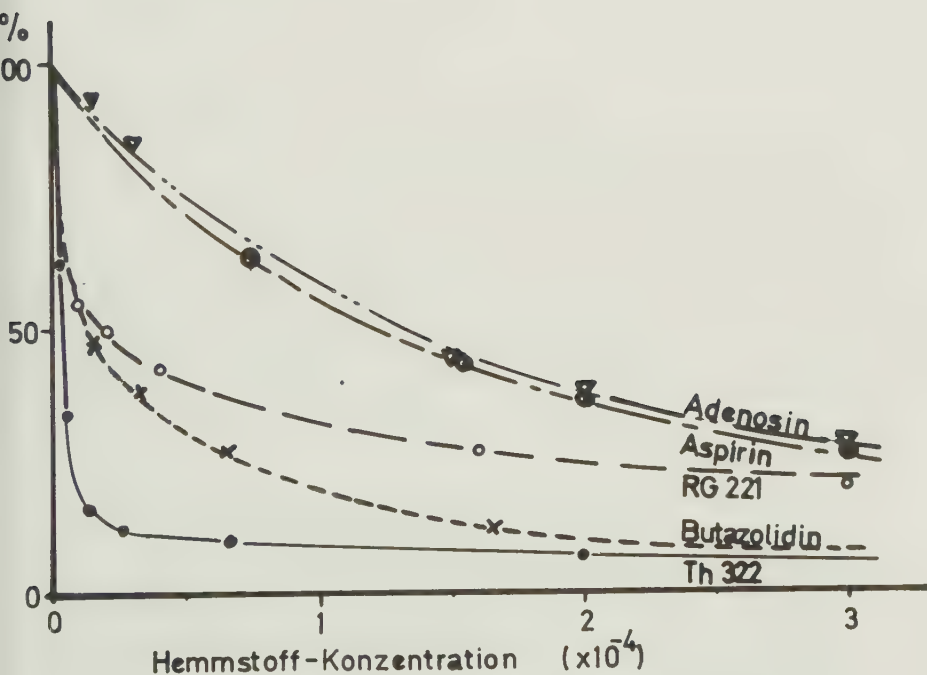
Tab. 8.1.



dann die Hemmung durch RG 221 nicht so stark an wie bei Butazolidin, so daß bei einer Konzentration von ca.  $4 \times 10^{-4} \text{ M}$  die Hemmung durch RG 221 genauso groß ist wie durch Aspirin.

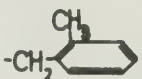
Adenosin hemmt die Plättchenaggregation stärker als cycl. AMP und ungefähr genauso stark wie ATP (vergl. Abb. 10.1.1.).

Abb. 8.1.



# STRUKTURFORMELN DER ADENOSIN-DERIVATE



| SUBSTANZ | R <sub>1</sub>                                                                    | R <sub>2</sub> |
|----------|-----------------------------------------------------------------------------------|----------------|
| ADENOSIN | H                                                                                 | H              |
| Th322    |  | H              |
| ATP      | H                                                                                 | ~Θ~Θ~Θ         |

## 8.2. Gruppe der wichtigsten Stoffe ohne hemmende Wirkung auf die Plättchenaggregation

Eine Reihe von Substanzen hat keine hemmende Wirkung auf die Human-Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation:

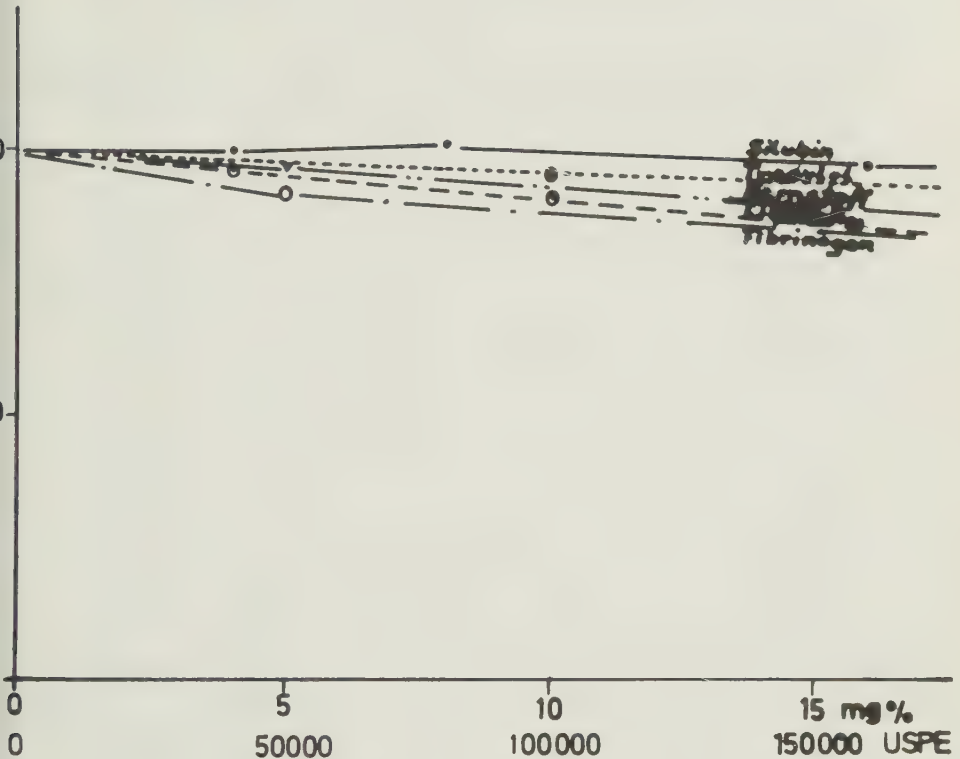
Zur Untersuchung der in-vivo-Hemmwirkung von Marcumar haben wir eine Reihe von Patienten untersucht, die mit Marcumar auf Dauer behandelt wurden. Der Quick-Wert befand sich in all diesen Fällen im therapeutischen Bereich von 10-20%. Trotzdem war keinerlei Hemmung der Plättchenaggregation zu beobachten (vergl. Tab. 1.1. - Spender Nr. 25).

In-vitro-Untersuchungen der Wirkung von Trasylol, Harnstoff und Liquemin auf die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation ergaben ebenfalls keinen Hemmeffekt.

Fibrinogen zeigte eine geringe Hemmung der Thrombozytenaggregation, desgleichen die oberflächenaktiven Substanzen TWEEN 80 und CREMOPHOR.

Die Dosis-Wirkungsbeziehungen der wichtigsten Substanzen sind in Abb. 8.2. wiedergegeben.

Abb. 8.2.



9. Übersicht über die hemmende Wirkung von 15 Salicylsäure-Derivaten auf die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation

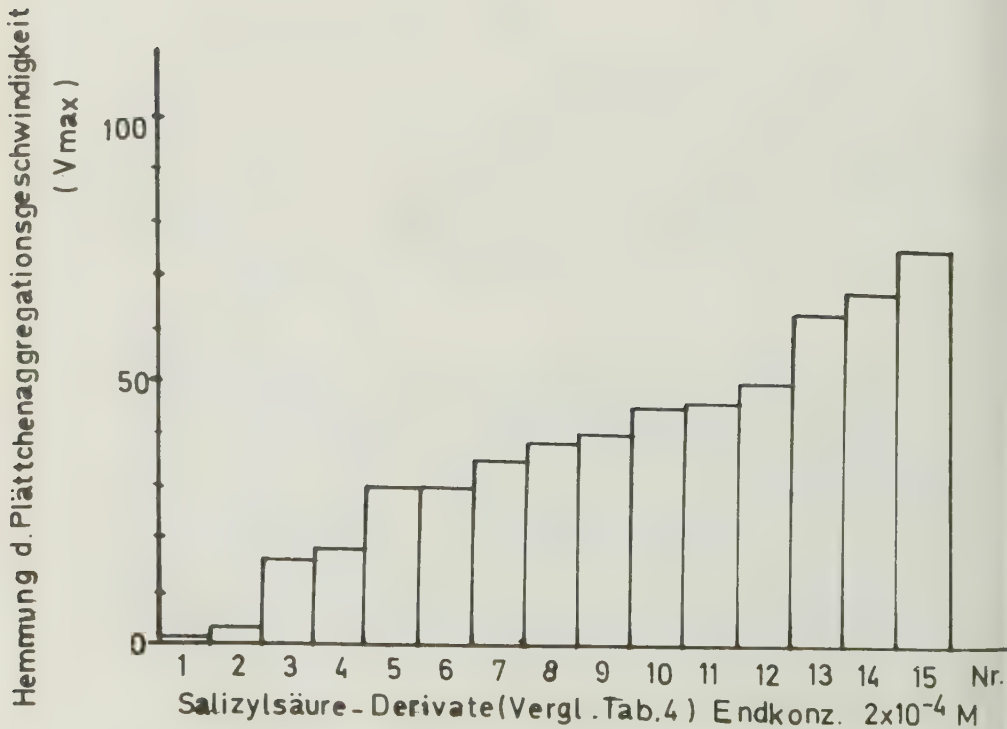
Nach Einnahme von Acetyl-Salicylsäure findet man in vitro eine Hemmung der Plättchenadhäsivität (BOUNAMEAUX und van CAUWENBERGE (7) und GAST (17)) und der Plättchenaggregation, welches therapeutisch bereits bei thrombotischen Erkrankungen ausgenutzt wurde (SCHARRER, SCHEPPING u. BREDDIN (49)).

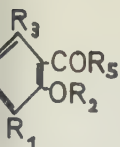
Die von uns mit Salicylsäure-Abkömmlingen durchgeführten Untersuchungen hatten zum Ziel zu prüfen, inwieweit dieser Effekt auch anderen Salicylsäure-Derivaten eigen ist. Geprüft wurde die hemmende Wirkung auf die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation. Die Ergebnisse sind als %-Hemmung von  $V_{max}$  in Abb. 9.1. wiedergegeben.

Es fällt dabei besonders auf, daß die Substanzen RG 219 und RG 221, welche beide die Thrombozytenaggregation stärker hemmen als Acetyl-Salicylsäure, eine fast identische Strukturformel haben.

Salicylsäure selbst hat dagegen einen sehr schwachen hemmenden Effekt auf die Plättchen.

Abb. 9.1.



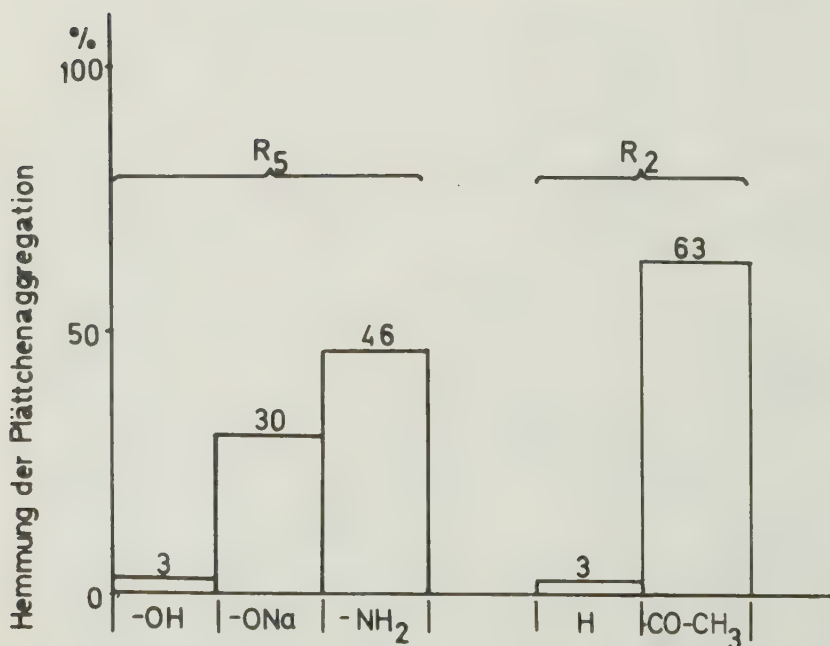


# Strukturformeln der Salizylsäurederivate

| Nr. | Name                         | $R_1$                                        | $R_2$                    | $R_3$         | $R_4$         | $R_5$          |
|-----|------------------------------|----------------------------------------------|--------------------------|---------------|---------------|----------------|
| 1   | RG 223                       | $-\text{CH}-\text{CH}=\text{CH}_2$<br>       | H                        | H             | H             | OH             |
| 2   | Salizyl-<br>Säure            |                                              | H                        | H             | H             | OH             |
| 3   | RG 225                       | $-\text{CH}_2-\text{CH}_2-$                  | H                        | H             | H             | OH             |
| 4   | He 279                       | $-\text{C}=\text{CH}-$<br>$\text{CH}_3$      | H                        | H             | H             | OH             |
| 5   | He 284                       | $-\text{S}-\text{CH}_2-$                     | H                        | H             | H             | OH             |
| 6   | Na-Sali-<br>zylat            |                                              | H                        | H             | H             | ONa            |
| 7   | He 275                       | $-\text{CH}-\text{CH}_3$<br>                 | H                        | OH            | H             | OH             |
| 8   | RG 203                       | $-\text{CH}-\text{CH}_3$<br>                 | H                        | H             | H             | OH             |
| 9   | RG 208                       | $-\text{C}-\text{CH}_3$<br><br>$\text{CH}_3$ | H                        | H             | H             | OH             |
| 10  | He 277                       | $-\text{CH}=\text{CH}-$                      | H                        | H             | H             | OH             |
| 11  | Salizyl-<br>amid             |                                              | H                        | H             | H             | $-\text{NH}_2$ |
| 12  | RG 211                       | $-\text{C}-\text{CH}_2-\text{CH}_3$<br>      | H                        | H             | H             | OH             |
| 13  | Acetyl-<br>salizyl-<br>säure |                                              | $-\text{CO}-\text{CH}_3$ | H             | H             | OH             |
| 14  | RG 219                       | $-\text{CH}-\text{CH}_3$<br>                 | H                        | $\text{CH}_3$ | H             | OH             |
| 15  | RG 221                       | $-\text{CH}-\text{CH}_3$<br>                 | H                        | H             | $\text{CH}_3$ | OH             |

Ergebnis:

1. Substitution von  $R_1$ : Hier läßt sich kein System erkennen. Auffallend ist, daß jeweils verwandte Kombinationen Nr. 1 und Nr. 12 einerseits und Nr. 3 und Nr. 10 andererseits deutlich unterschiedliche Hemmwirkungen zeigen. Bei dem Paar Nr. 1 und Nr. 12 ist die Substanz mit Doppelbindung ohne Wirkung, während die hydrierte Form maximale Aktivität zeigt. Bei dem Paar Nr. 3 und Nr. 10 ist genau das Gegenteil der Fall: Hier ist Doppelbindung viel wirksamer als die hydrierte Form.
2. Substitution von  $R_2$  und  $R_5$ : Durch Substitution der Hydroxy-Gruppe ( $R_2$ ) und Carboxylgruppe ( $R_5$ ) steigert sich die hemmende Wirkung auf die Plättchenaggregation wie folgt:



3. Substitution von  $R_3$  und  $R_4$ : Die Einführung einer Hydroxy-Gruppe vermindert die hemmende Wirkung, während die Anlagerung einer Methyl-Gruppe die Hemmung der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation deutlich verstärkt.

9.1. Hemmung der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation durch Acetylsalicylsäure bei 7 verschiedenen Spendern

Bei der Hemmung der durch Human-Prokollagen induzierten Plättchenaggregation fiel uns auf, daß Plättchen verschiedener Spender sehr unterschiedlich durch ein und dieselbe Substanz gehemmt werden. Wir untersuchten daraufhin die Hemmung von Acetylsalicylsäure auf Plättchen von 7 verschiedenen Spendern. Ein Spender war zweimal vertreten, nämlich vor und während der Einnahme von Tanderil (vergl. Abb. 9.4.2.).

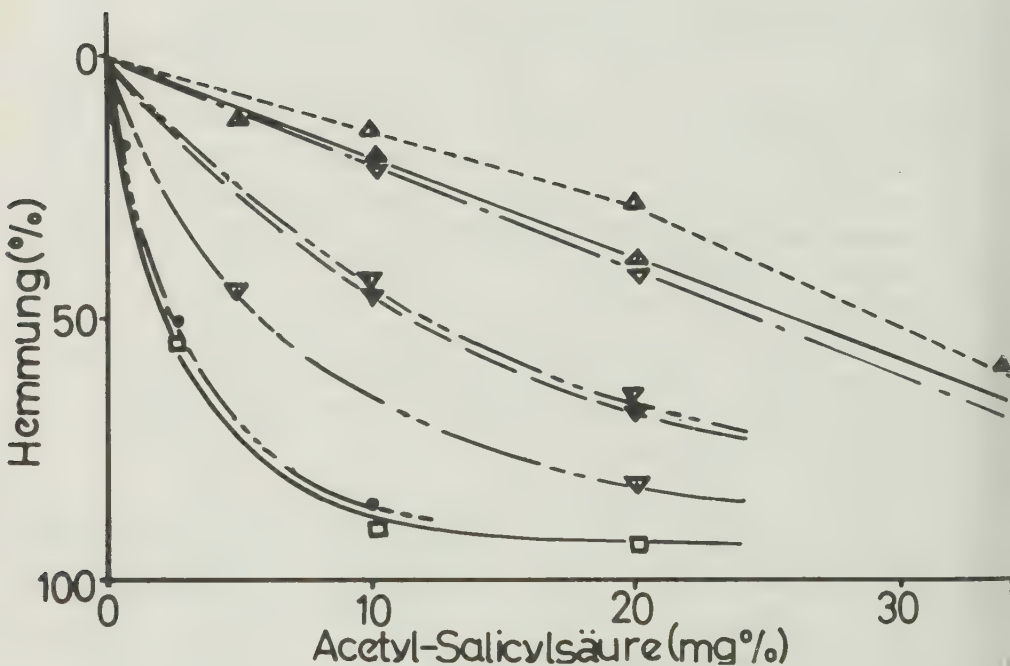
Die Parameter der Ausgangsaggregationen nach Zusatz von Human-Prokollagen zu plättchenreichem Plasma und die Hemmung der Aggregation nach Zusatz von 5 mg% Acetylsalicylsäure sind in Tab. 9.1. zusammengestellt.

Tab. 9.1.

| Nr. | Symbol<br>(vergl. Tab. 1.1.) | klin. Diagnose                       | Ausg.-<br>Konz.<br>$\times 10^8/\text{ml}$<br>( $P_0$ ) | Vmax | Plätt.-<br>aggreg.<br>$\times 10^8/\text{ml}$<br>( $P_0-P_1$ ) | %  | Vmax/<br>$P_0=3,0$<br>$\times 10^8/\text{ml}$ | % Hemmung<br>von Vmax<br>nach 5 mg%<br>Acet.Salic<br>(=<br>$\sim 3 \times 10^{-4} \text{M}$ ) |
|-----|------------------------------|--------------------------------------|---------------------------------------------------------|------|----------------------------------------------------------------|----|-----------------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------|
| 1   | □                            | gesund                               | 4,8                                                     | 0,3  | 2,5                                                            | 52 | 0,19                                          | 73%                                                                                           |
| 2   | ●                            | Essent.Hypert.                       | 3,5                                                     | 0,1  | 1,55                                                           | 44 | 0,09                                          | 70%                                                                                           |
| 3   | ▲                            | RR↑ Arth.def.                        | 5,6                                                     | 0,43 | 3,3                                                            | 59 | 0,23                                          | 10%                                                                                           |
| 4   | ▼                            | RR↑ Arth.def.<br>+ Tanderil          | 4,85                                                    | 0,19 | 1,85                                                           | 38 | 0,2                                           | 26%                                                                                           |
| 5   | ▽                            | Rez.Thromboemb.<br>/Antikoag.        | 3,0                                                     | 0,6  | 2,2                                                            | 73 | 0,6                                           | 10%                                                                                           |
| 6   | ▲                            | Harnwegsinfekt                       | 3,2                                                     | 0,29 | 2,05                                                           | 64 | 0,27                                          | 8%                                                                                            |
| 7   | ▼                            | unkl. BSG↑                           | 3,6                                                     | 0,22 | 2,2                                                            | 61 | 0,19                                          | 25%                                                                                           |
| 8   | ▽                            | ält.Beinv.Throm-<br>bose + Osteopor. | 2,8                                                     | 0,42 | 2,1                                                            | 75 | 0,45                                          | 45%                                                                                           |

Die sich für die untersuchten 8 Plättchenpopulationen ergebenden Dosis-Wirkungskurven bei Zusatz von steigenden Mengen Acetylsalicylsäure sind in Abb. 9.1.1. wiedergegeben

Abb. 9.1.1.



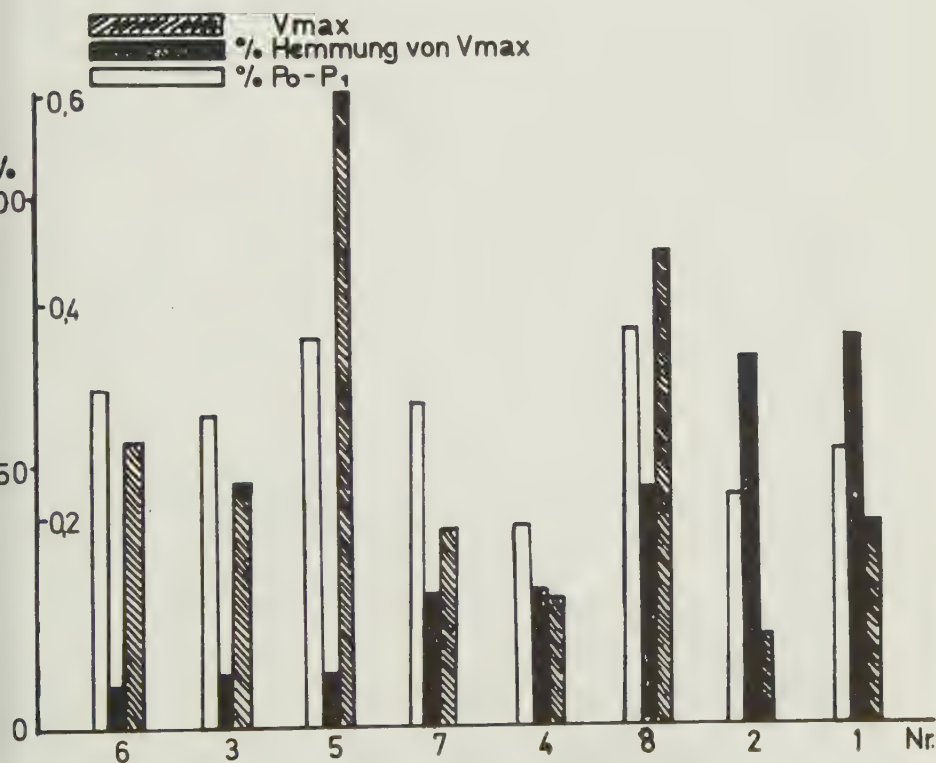
Ergebnis:

1. Man sieht, daß die Dosis-Wirkungskurve von Spender zu Spender sehr verschieden ist.
2. Bei einer Konzentration von 5 mg% Acetyl-Salicylsäure schwankt die Hemmung der Plättchenaggregationsgeschwindigkeit (%Vmax) von 8-73%.
3. Die  $ED_{50}$  differiert um den Faktor 10 - nämlich von 2,5 bis 25 mg% Acetyl-Salicylsäure.

4. Die Dosis-Wirkungskurve des Spenders Nr. 3 verläuft nach Tanderilbehandlung (Nr. 4 - vergl. Tab. 9.1.) steiler - d.h. die  $ED_{50}$  vermindert sich von 24 mg% auf 12 mg% Acetyl-Salicylsäure.

In Abb. 9.1.2. sind die in Tab. 9.1. aufgeführten 3 Parameter der Plättchenaggregation und ihrer Hemmung durch Acetyl-Salicylsäure zusammengefaßt. Die Parameter  $V_{max}$ ,  $P_0-P_1$  und die % Hemmung der Plättchenaggregationsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) durch Acetyl-Salicylsäure sind nach dem letzten Parameter (% Hemmung von  $V_{max}$ ) geordnet. Eine Beziehung zwischen den Parametern der ungehemmten Plättchenaggregation ( $\%P_0-P_1$  und  $V_{max}$ ) und der jeweiligen Hemmwirkung von Acetyl-Salicylsäure auf die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation läßt sich nicht aufzeigen.

Abb. 9.1.2.

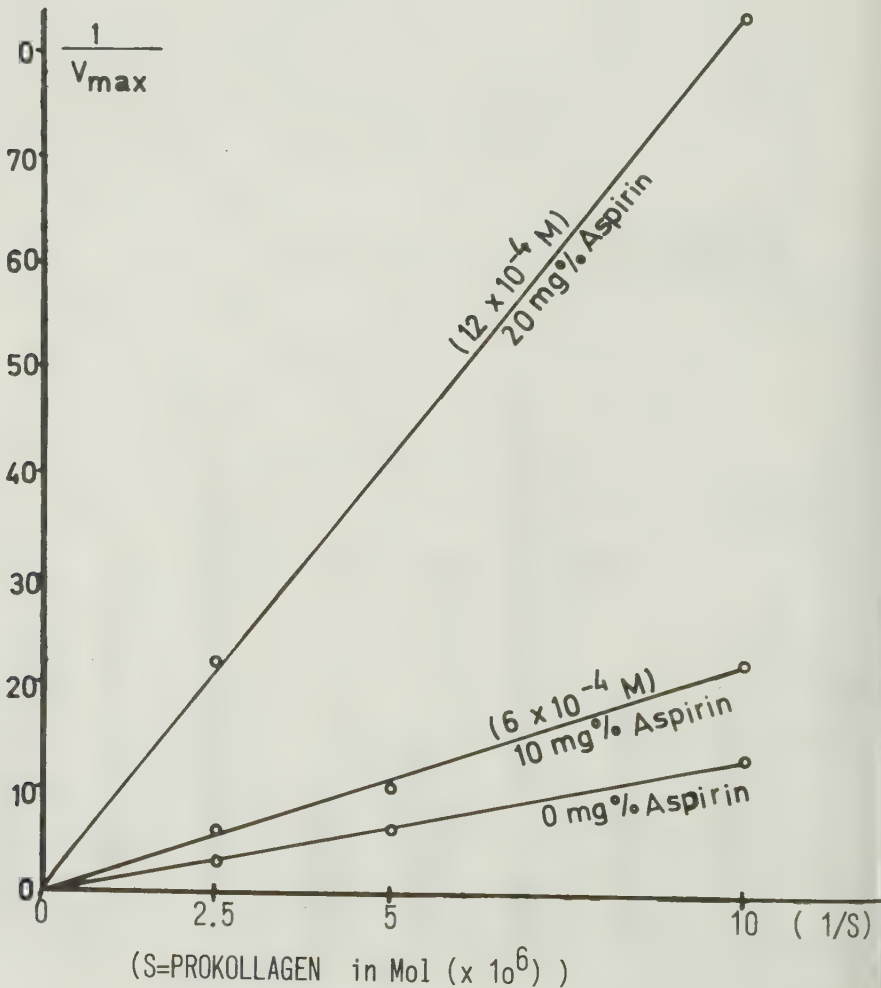


Vergleiche Spender-Nr. mit Tab. 9.1.

### 9.2. Art der Acetyl-Salicylsäurehemmung

Aggregiert man plättchenreiches Plasma mit steigenden Konzentrationen Human-Prokollagen (3, 6 und 12 mg%) und hemmt die jeweils erzielte Plättchenaggregation mit 10 und 20 mg% Acetyl-Salicylsäure, dann ergeben sich bei der graphischen Darstellung nach LINEWEAVER-BURK die in Abb. 9.2. wiedergegebenen Verhältnisse.

Abb. 9.2.



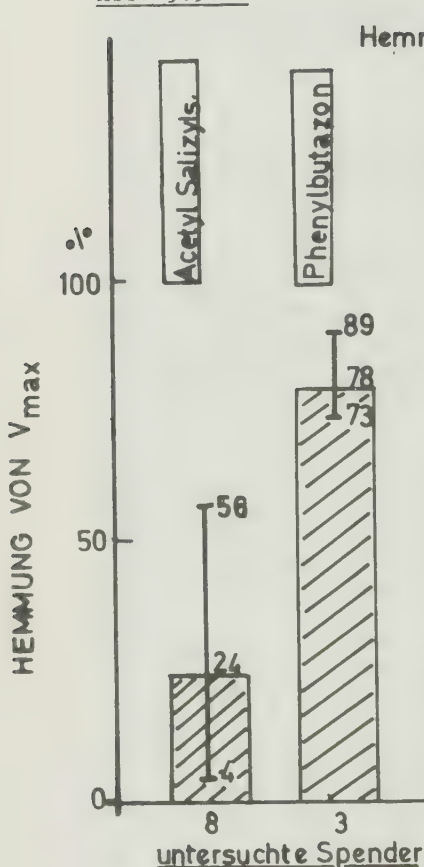
Die erzielte Hemmung der Plättchenaggregation mit Acetyl-Salicylsäure entspricht der einer KOMPETITIVEN Hemmung.

### 9.3. Vergleich der hemmenden Wirkung von Acetyl-Salicylsäure und Phenylbutazon

In Tab. 8.1. wurde gezeigt, daß zwei bekannte, in der Klinik seit langer Zeit eingeführte Pharmaka, Acetyl-Salicylsäure und Phenylbutazon, die beide analgetisch, antiphlogistisch und antipyretisch wirken, einen starken hemmenden Effekt auf die durch Prokollagen induzierte Plättchenaggregation haben.

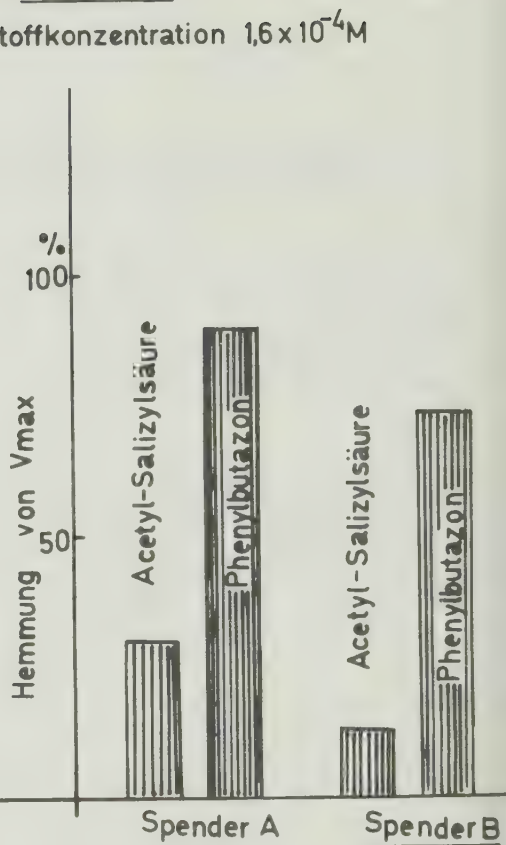
Um zu zeigen, daß Phenylbutazon in vitro eine deutlich stärkere Wirkung auf die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation hat als Acetyl-Salicylsäure, haben wir unsere Ergebnisse in Abb. 9.3.a. und Abb. 9.3.b. noch einmal zusammengefaßt.

Abb. 9.3.a.



Zusammenfassung aller mit Acetyl-Salicylsäure und Phenylbutazon erzielten Hemmergebnisse (Hemmstoffkonzentration  $1,6 \times 10^{-4} \text{M}$ )

Abb. 9.3.b.

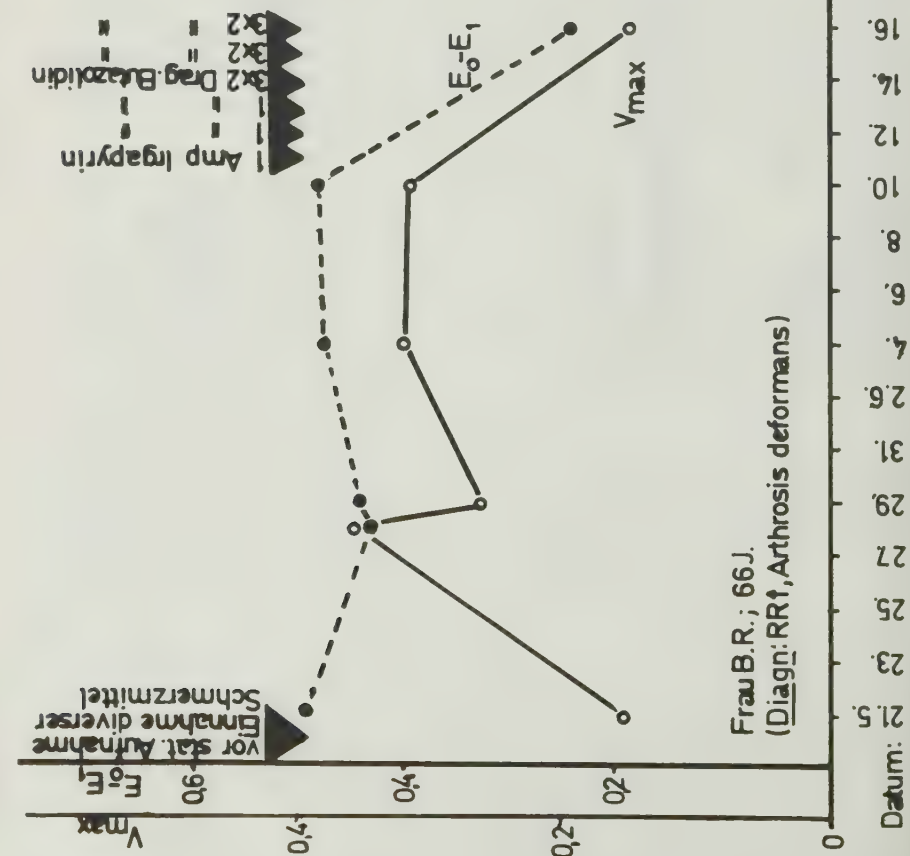


Unterschiedlich starke Hemmung der Plättchenaggregation durch Acetyl-Salicylsäure und Phenylbutazon demonstriert an 2 Einzelfällen

#### 9.4. Hemmung der Plättchenaggregation durch Phenylbutazon und dessen Derivate

Phenylbutazon hat auch in vivo in therapeutischer Dosierung einen Effekt auf die Thrombozytenaggregation. Dies konnten wir bei Bestimmung der Human-Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation an zwei Patienten beobachten, die wir über längere Zeit als Spender benutzten, ohne zunächst von einer medikamentösen Behandlung zu wissen. Es ergab sich bei jeder Patientin in der Beobachtungszeit eine deutliche Verminderung der Aggregationsgeschwindigkeit und Reduzierung der Anzahl insgesamt aggregierenden Plättchen. Erst die nachträgliche Suche nach einer Ursache für die Hemmung der Thrombozytenfunktion ergab, daß der erste Patient Irgapyrin, später Butazolidin, und der zweite Patient Tanderil über einige Tage verabreicht bekommen hatte. Die Therapie ging immer exakt der beobachteten Verschlechterung der Plättchenaggregation voraus. Die Dauer der medikamentösen Behandlung und die genaue Dosierung sind aus Abb. 9.4.1. und Abb. 9.4.2. zu entnehmen.

Abb. 9.4.1.

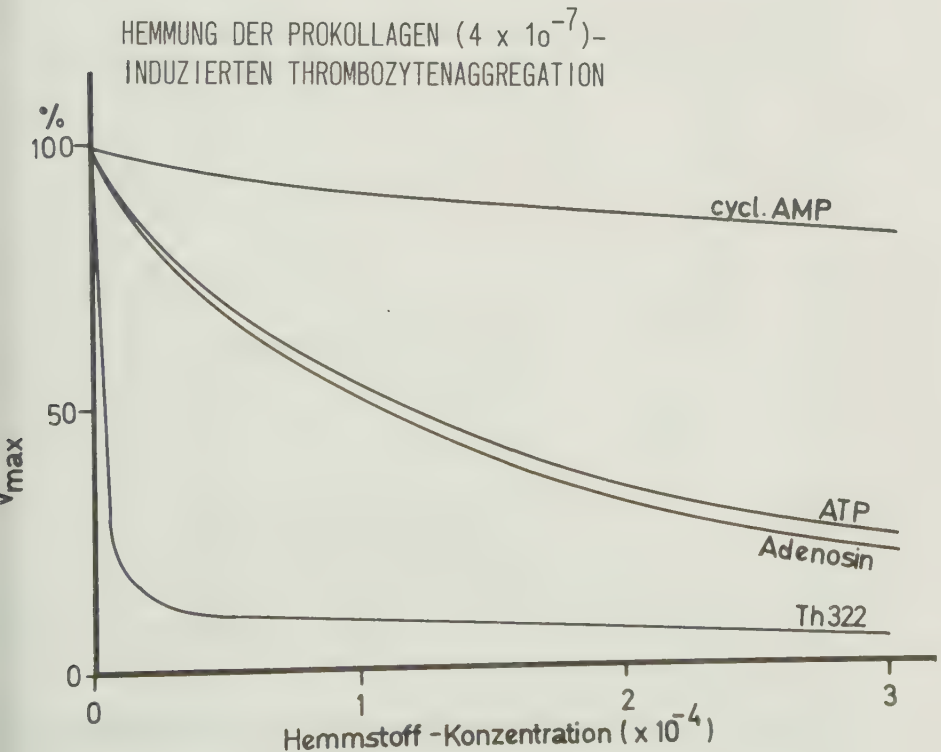


# 10. Hemmung der Plättchenaggregation durch Adenosin-Derivate

GAARDNER u.Mitarb. (16) haben 1961 als erste auf die plättchenaggregierende Wirkung von ADP in vitro hingewiesen. Nachfolgende Untersuchungen ergaben, daß die meisten anderen Adenosin-Derivate einen zur ADP-Wirkung antagonistischen, aggregationshemmenden Effekt haben (BORN (3), CLAYTON u.Mitarb. (12)).

Die durch Human-Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation wird ebenfalls durch Adenosin und dessen Derivate ATP, cycl. AMP und Th 322 gehemmt, wie die Dosis-Wirkungskurven in Abb. 10.1.1. zeigen. Man sieht wieder im Vergleich zu den anderen Adenosinabkömmlingen die überragende Hemmwirkung von Th 322.

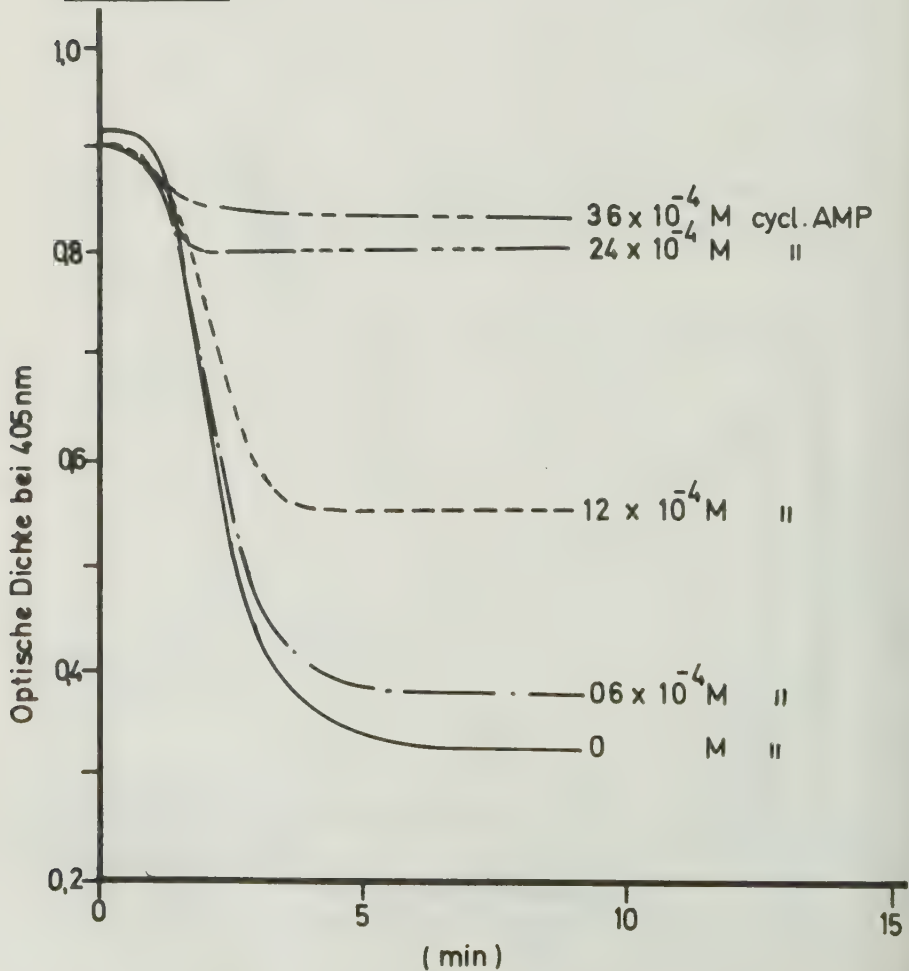
Abb. 10.1.1.



10.1. Abhängigkeit der Hemmung der Prokollagen-induzierten  
Plättchenaggregation von der cycl.AMP-Konzentration

In Abb. 10.1.2. sind die Extinktionskurven zusammengestellt, die sich bei Plättchenaggregation durch 12 mg% Human-Prokollagen ergeben, wenn zusätzlich cycl.AMP in steigenden Dosen zugesetzt wird. Man sieht, daß durch cycl.AMP in erster Linie die Anzahl max. aggregierender Plättchen ( $E_0-E_1$ ) abnimmt. Die Hemmung der Plättchenaggregation bewirkt jedoch niemals, wie bei der ADP- und Arterenol-induzierten Plättchenaggregation, eine Desaggregation bereits aggregierter Plättchen.

Abb. 10.1.2.



## 10.2. Vergleich der hemmenden Wirkung von Adenosin-Derivaten auf die ADP-, Arterenol- und Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation

Die heute gültige Theorie besagt, daß die ADP- und Arterenol-induzierte Plättchenaggregation in der 1. Phase durch eine direkte Wirkung der Pharmaka auf die Plättchen bedingt ist, in der 2. Phase durch die Freisetzung von endogenem ADP aus den Plättchen.

Diese biphasische Aggregation der Plättchen läßt sich mit Arterenol ( $2,2 \times 10^{-5}M$ ) in unserem photometrischen Testsystem demonstrieren (vergl. Abb. 10.2.1.), während wir mit ADP ( $>1 \times 10^{-6}M$ ) nie einen biphasischen Abfall der Extinktionskurve beobachten konnten.

Untersucht man die Hemmung der Prokollagen-, ADP- und Arterenol-induzierten Plättchenaggregation durch Adenosin und dessen Derivate Th 322 und cycl.AMP, dann wird das unterschiedliche Verhalten der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation deutlich.

In Abb. 10.2.1.a-d sind die mit frischem PRP eines Spenders erhaltenen Plättchenaggregationskurven und die Hemmkurven zusammengestellt.

Die Endkonzentrationen der untersuchten Substanzen betragen:

Aggregationsinduzierende Substanzen:

|             |                       |
|-------------|-----------------------|
| Prokollagen | $4 \times 10^{-7}M$   |
| ADP         | $47 \times 10^{-7}M$  |
| Arterenol   | $220 \times 10^{-7}M$ |

Aggregationshemmende Substanzen:

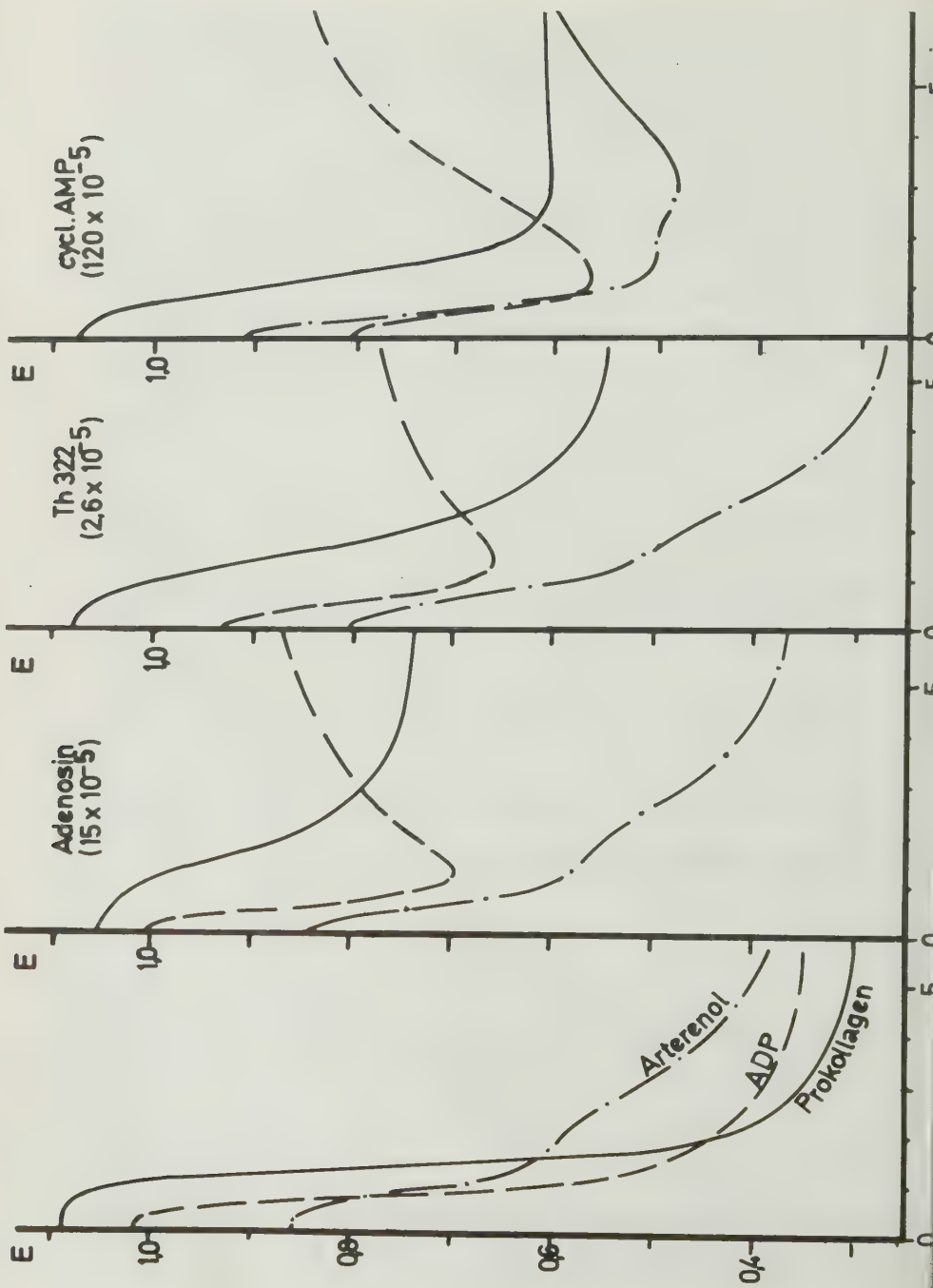
|          |                       |
|----------|-----------------------|
| Adenosin | $15 \times 10^{-5}M$  |
| Th 322   | $2,6 \times 10^{-5}M$ |
| cycl.AMP | $120 \times 10^{-5}M$ |

ADD. 10.2.1. a.

b.

c.

d.



# Ergebnis:

1. Die max. Plättchenaggregation beträgt bei

|                   |                                 |       |
|-------------------|---------------------------------|-------|
| Human-Prokollagen | $(4 \times 10^{-7} \text{M})$   | - 73% |
| ADP               | $(47 \times 10^{-7} \text{M})$  | - 67% |
| Arterenol         | $(220 \times 10^{-7} \text{M})$ | - 61% |

Die plättchenaggregierende Wirkung von Prokollagen ist somit deutlich stärker als die von ADP und Arterenol.

2. Die Arterenol-induzierte Plättchenaggregation ist biphasisch.
3. Nur die ADP- und Arterenol-induzierte Plättchenaggregation ist reversibel. Die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation ist irreversibel.
4. Adenosin und dessen Derivate Th 322 und cycl.AMP hemmen die 2. Phase der Arterenol-induzierten Plättchenaggregation, während die 1. Phase unverändert bleibt.
5. Hemmt man die ADP-induzierte Plättchenaggregation, dann wird auch hier der zweiphasische Ablauf der Reaktion deutlich. Die Hemmung wird erst in der 2. Phase wirksam, während die 1. Phase keinerlei Hemmung der Plättchenaggregation zeigt. Vergleicht man nun die 1. Phase der ADP-induzierten Plättchenaggregation mit der 1. Phase der Arterenol-induzierten Plättchenaggregation bei jeweils wirksamer Hemmung der 2. Phase der Aggregation durch Adenosin-Körper, dann erhält man folgende Ergebnisse:

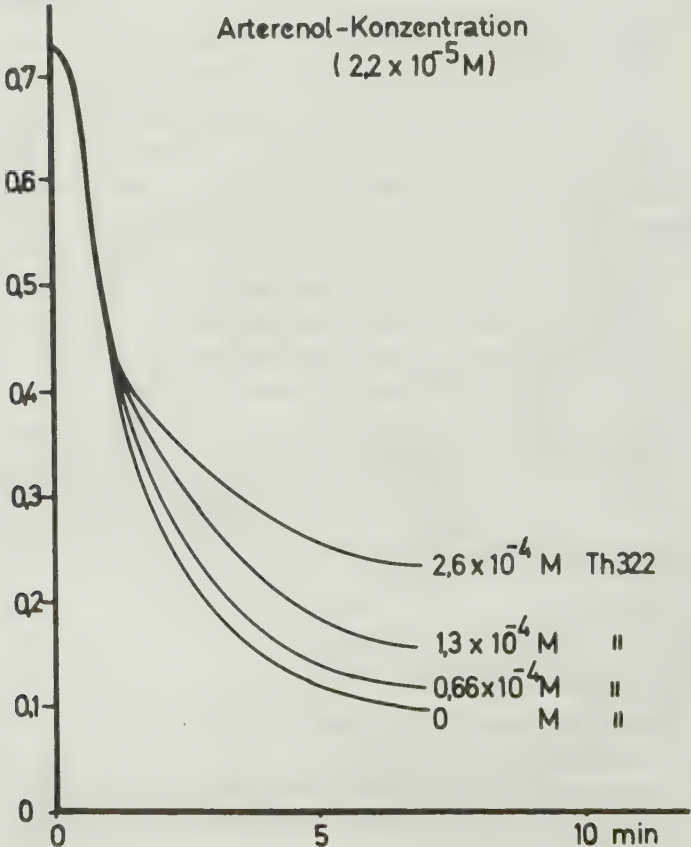
| Hemmung der Plättchenaggregation durch | Extinktionsabfall $(E_0 - E_1/E_0)$ während der 1. Phase der <u>Arterenol</u> -induzierten Plättchenaggregation | Extinktionsabfall $(E_0 - E_1/E_0)$ während der 1. Phase der <u>ADP</u> -induz. Plättchenaggregation |
|----------------------------------------|-----------------------------------------------------------------------------------------------------------------|------------------------------------------------------------------------------------------------------|
| Ø                                      | 0.30                                                                                                            | ?                                                                                                    |
| Adenosin                               | 0.31                                                                                                            | 0.30                                                                                                 |
| Th 322                                 | 0.31                                                                                                            | 0.32                                                                                                 |
| cycl.AMP                               | 0.37                                                                                                            | 0.37                                                                                                 |

Man sieht, daß die 1. Phase der Arterenol-induzierten Plättchenaggregation völlig identisch ist mit der 1. Phase der ADP-induzierten Plättchenaggregation und daß sie sich durch Adenosin und dessen Derivate nicht hemmen läßt.

6. Die Hemmung der ADP-induzierten Plättchenaggregation durch Adenosin-Körper ist deutlich größer als die der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation (trotz ca. 10fach höherer Konzentration des ADP gegenüber Prokollagen).
7. Adenosin und Th 322 hemmen in den gewählten Konzentrationen die Arterenol-induzierte Plättchenaggregation nicht.

Die Untersuchung der Hemmung der Arterenol-induzierten Plättchenaggregation durch Th 322 bei einem anderen Spender ergibt jedoch bei höheren Hemmstoff-Konzentrationen durchaus eine Hemmung der 2. Phase der Plättchenaggregation (vergl. Abb. 10.2.3)

Abb. 10.2.3.



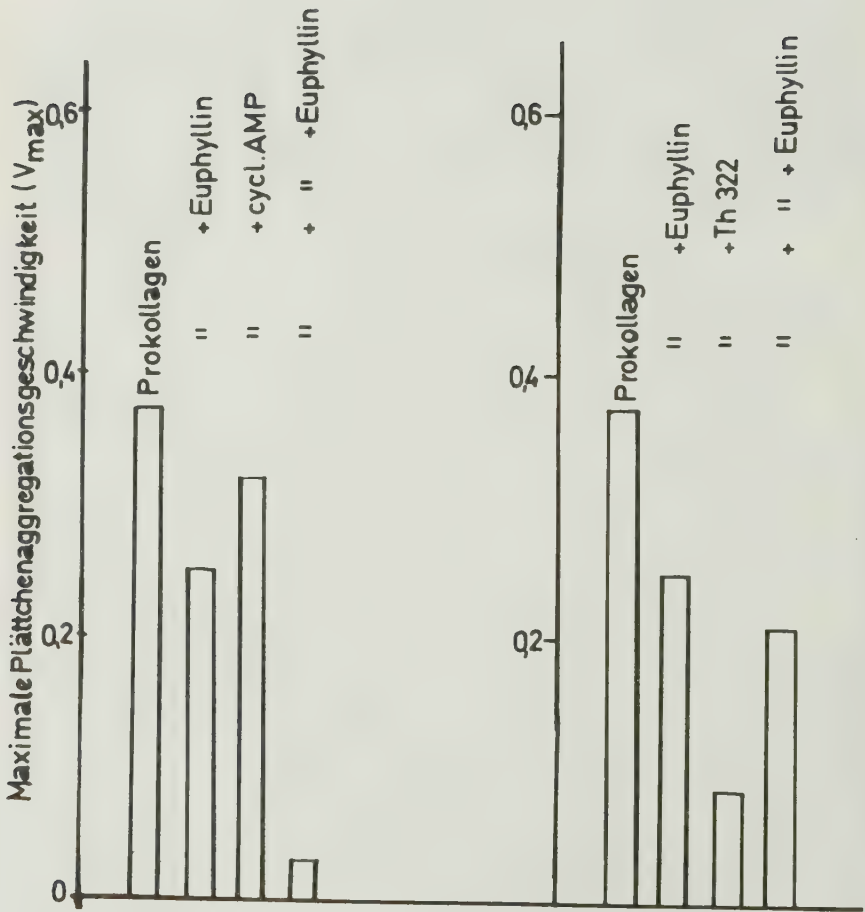
11. Gegenseitige Beeinflussung von Purin- und Adenosin-Derivaten in ihrer hemmenden Wirkung auf die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation

Untersucht man die Hemmung der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation bei gleichzeitigem Zusatz von zwei hemmenden Substanzen, dann findet man eine gegenseitige Beeinflussung der hemmenden Substanzen. So potenziert sich die Hemmwirkung von Euphyllin und cycl.AMP. Setzt man dagegen Euphyllin und Th 322 gleichzeitig zu, dann findet man das Gegenteil. Die hemmende Wirkung von Euphyllin und Th 322 zusammen ist geringer als die von Th 322 allein (vergl. Abb. 11).

Die Endkonzentrationen der in Abb. 11 untersuchten Substanzen betragen:

|             |                               |
|-------------|-------------------------------|
| Prokollagen | $4 \times 10^{-7} \text{M}$   |
| Euphyllin   | $45 \times 10^{-5} \text{M}$  |
| cycl.AMP    | $120 \times 10^{-5} \text{M}$ |
| Th 322      | $2,6 \times 10^{-5} \text{M}$ |

Abb. 11



## E. DISKUSSION

Durch die Arbeiten von SPAET u. ERICHSON (53), MURPHY (35) und MUSTARD (36, 37) ist die Bedeutung der Rolle der Thrombozyten in der Thrombogenese aufgezeigt worden. Bei allen Läsionen der Gefäßwand setzt die intravasale Thrombozytenaggregation noch vor der Aktivierung der Gerinnungsfaktoren ein und bestimmt somit die Entwicklung der Thrombose entscheidend. Eine sinnvolle Prophylaxe der Thrombose muß demzufolge eine überschießende Thrombozytenaggregation verhindern.

Antikoagulantien, die heute bei bestehender Disposition zu thromboembolischen Erkrankungen zur Prophylaxe angewandt werden, vermögen die pathologisch gesteigerte Aggregationsneigung der Plättchen nicht zu hemmen (49). Thromboembolische Rezidive werden deshalb in der Klinik immer wieder trotz eingeleiteter Antikoagulantientherapie beobachtet.

In den letzten Jahren wurden große Anstrengungen unternommen, zu einer wirkungsvolleren Prophylaxe der Thrombose zu kommen. In der Absicht, die Thrombogenese bereits in ihrer Entstehung zu hemmen, konzentrieren sich die Bemühungen der Forscher in erster Linie auf die Hemmung der Thrombozytenaggregation. Eine ganze Reihe von Substanzen wurde in der Zwischenzeit auf ihre thrombozytenaggregationshemmende Wirkung untersucht. Die mitgeteilten Ergebnisse sind jedoch bis jetzt nicht mehr als erste Angaben über die qualitative Wirkung von Substanzen auf die Thrombozytenaggregation. Eine quantitative Beurteilung der Hemmstoffe und ein Vergleich der Ergebnisse verschiedener Autoren scheitert

1. an der Vielzahl unterschiedlicher Testmethoden zur Prüfung der Thrombozytenaggregation und
2. an der Vielzahl unterschiedlicher Substanzen, die in vitro zur Auslösung der Thrombozytenaggregation benutzt werden.

Die wichtigsten Testmethoden zur Bestimmung der Wirkung von Hemm-Substanzen auf die Thrombozytenfunktion sind:

1. In-vivo-Methoden:

a) Bestimmung der Blutungszeit nach DUKE.

QUICK (45) konnte zeigen, daß unter Acetyl-Salicylsäure-Medikation die Blutungszeit nach DUKE signifikant verlängert ist.

2. In-Vitro-Methoden:

a) Plättchenaggregationstest nach BREDDIN (PAT) (9).

SCHARRER, SCHEPPING und BREDDIN (49) haben mit dieser Methode die klinische Anwendung von Acetyl-Salicylsäure bei thromboembolischen Erkrankungen kontrolliert und eine befriedigende Parallelität zwischen Besserung des klinischen Verlaufs und Veränderung des PAT von Stufe 5 auf Stufe 2 gezeigt.

b) Lichtoptische Methode nach BORN (5)

O'BRIEN (40) hat mit Hilfe dieser Methode die Wirkung von Acetyl-Salicylsäure auf die durch verschiedene Substanzen ausgelöste Plättchenaggregation untersucht.

Zusammen mit OXON hat O'BRIEN (42) außerdem die Wirkung verschiedener entzündungshemmender Substanzen auf die Adrenalin- und Kollagen-induzierte Plättchenaggregation untersucht.

Die wichtigsten Substanzen zur Auslösung einer Thrombozytenaggregation in vitro sind:

a) ADP

b) Adrenalin bzw. Noradrenalin

c) Kollagen bzw. Prokollagen

Für die von uns geplanten Untersuchungen über die Hemmwirkung von Pharmaka auf die Thrombozytenaggregation in vitro haben wir die von D. HEINRICH (21) beschriebene Modifikation der lichtoptischen Methode nach BORN (5) gewählt, weil diese Methode einmal die Möglichkeit bietet, Plättchenaggregate

von einzeln suspendierten Plättchen zu unterscheiden - zum anderen in einem künstlichen Kreislaufsystem die physiologischen Strömungsverhältnisse nachahmt. Als aggregationsauslösende Substanz haben wir HUMAN-Prokollagen benutzt in der Vorstellung, daß Prokollagen auch in vivo der entscheidende Gefäßwandbestandteil ist, der im Falle einer Thrombose die überschießende Thrombozytenaggregation auslöst.

Eine kritische Betrachtung des von uns gewählten Testsystems ergibt, daß die Schwankungsbreite bei Parallelversuchen gering ist. Die bei 37°C vorgenommene Mehrfachbestimmung der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation ergibt eine Schwankungsbreite der maximalen Aggregationsgeschwindigkeit  $V_{max}$  von  $\pm 5\%$ , während die Bestimmung der insgesamt aggregierten Plättchen eine Abweichung von  $\pm 10\%$  zeigt. Mit steigender Temperatur nimmt die Aggregationsgeschwindigkeit zu, während die Zahl der insgesamt irreversibel aggregierten Plättchen annähernd konstant bleibt. Die Verlaufsbestimmung der Plättchenaggregation bei einem Patienten über mehrere Tage ergibt ein weitgehend einheitliches Aggregationsverhalten von Tag zu Tag, so daß die gewählte Testmethode auch zur Kontrolle der Hemmwirkung von Pharmaka in vivo geeignet erscheint. Die vor der Blutentnahme aus der Cubitalvene übliche Anstauung des Arms verändert die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation nicht.

Um die Hemmung der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation in vitro studieren zu können, haben wir zunächst versucht zu klären, ob es ein "normales" Aggregationsverhalten der frischen Plättchen von Spendern und unauffälligen Patienten nach Zusatz von HUMAN-Prokollagen gibt.

D. HEINRICH (21) hat bei den mit KALBS-Prokollagen-induzierten Plättchenaggregationen beobachtet, daß die Plättchen gesunder Spender eine immer ungefähr gleiche Aggregationsgeschwindigkeit zeigen (vergl. die leeren Kreise in Abb. 1.2.3.). Die von uns untersuchten 22 Plättchenkonserven von 4 gesun-

den Spendern und 18 Patienten, die keine Thrombozytenfunktionsstörung erwarten ließen, zeigten ebenfalls, wie in Abb. 1.2.3. (volle Kreise) zu sehen, ein annähernd gleiches Aggregationsverhalten. Die in unseren Versuchen beobachtete große Streuung der mittleren Plättchenaggregationsgeschwindigkeit von  $\pm 33\%$  (gegenüber nur 10% bei D. HEINRICH) ist vielleicht auf den großen Anteil von "unauffälligen" Patienten in unserem Spenderkollektiv zurückzuführen.

Gegenüber der "normalen" Plättchenaggregationsgeschwindigkeit deutlich erhöht fanden wir die Aggregationsneigung bei 3 Patienten, deren Krankengeschichte eine frische Beinvenenthrombose und rezidivierende thromboembolische Ereignisse aufwies. Interessanterweise stammen die Plättchen mit der größten Aggregationsgeschwindigkeit von einer Patientin mit operierter Mitralstenose, die wegen rezidivierenden Thromboembolien seit 1/2 Jahr optimal antikoaguliert war. 4 Plättchenkonserven waren gekennzeichnet durch eine gegenüber der Norm verlangsamte Thrombozytenaggregation. Davon stammt 1 Konserve von einem Patienten, dessen Plättchen medikamentös in ihrer Aggregationsfähigkeit gehemmt waren. Unklar ist, warum bei den 3 anderen Konserven die Plättchenaggregationsgeschwindigkeit herabgesetzt war. Klinisch waren die 4 Patienten mit verminderter Aggregationsneigung der Plättchen unauffällig.

Ob die bei 3 Patienten signifikant erhöhte Plättchenaggregationsgeschwindigkeit bei allen Patienten mit thromboembolischen Ereignissen zu finden ist, wurde von uns nicht untersucht. ZAHAVI und DREYFUSS (60) haben aber zeigen können, daß dies offensichtlich zumindest für den akuten Herzinfarkt gilt, denn hier konnten die Autoren eine deutliche Steigerung der ADP-induzierten Plättchenaggregation finden.

Die Fähigkeit des Säugetier-Prokollagens, Human-Thrombozyten zu aggregieren, scheint nicht artspezifisch zu sein, denn das Ausmaß der Thrombozytenaggregation ist bei gleicher Konzentration der Prokollagenlösungen für HUMAN-, KALB- und RATTEN-Prokollagen identisch (vergl. Abb. 1.2.4. und Abb. 2.1.).

Diese Beobachtung stimmt mit physikalisch-chemischen Untersuchungen und Studien der Aminosäuresequenz überein, welche keine signifikanten Unterschiede zwischen den Säugetier-Kollagenen finden (55).

Nach WILNER u.Mitarb. (57) sind es freie Aminogruppen des Kollagenmoleküls, die die plättchenaggregierende Aktivität des Kollagens bedingen. Eine Desaminierung bzw. N-Acetylierung führt zum Verlust der aggregierenden Eigenschaften des Kollagens. Y. LEGRAND u.Mitarb. (Lit. bei 1) nehmen an, daß diese aktiven Stellen des Kollagenmoleküls durch Kohlenhydrate, besonders Glukosamin, blockiert werden können. Der relative Glukosamingehalt des Kollagens nimmt jedenfalls im Alter zu, während die plättchenaggregierende Fähigkeit des Kollagens im Verlaufe des Lebens abnimmt (BANKOWSKI u.Mitarb. (1)). Ob hierfür auch eine Zunahme der intermolekularen und intramolekularen Bindungen des Kollagens angeschuldigt werden kann, läßt sich nicht mit Sicherheit sagen. Dafür spricht die im Verlaufe des Lebens zunehmende Polymerisation des Kollagens, welches sich in einem immer größer werdenden Anteil unlöslichen Kollagens im Gewebe manifestiert. Welche Anteile des Kollagenmoleküls bei der Polymerisation so verändert werden, daß sie für die plättchenaggregationsinduzierende Wirkung ausfallen, ist nicht bekannt. Die Telo peptide des Kollagenmoleküls kommen hierfür nicht in Frage, denn nach Pepsin-Behandlung kommt es zwar zum Verlust der Telo peptide und damit auch der Fähigkeit zu polymerisieren, nicht aber zur Aufhebung der Fähigkeit, Plättchen zu aggregieren (D. HEINRICH (21)).

Auch das von uns hergestellte HUMAN-Prokollagen polymerisiert so gut wie nicht - besitzt aber seine volle plättchenaggregierende Aktivität. Wieso es trotz gleichem Herstellungsverfahren zu einem unterschiedlichen Polymerisationsverhalten von HUMAN- und RATTEN-Prokollagen kommt, bleibt offen. Ob hierfür möglicherweise die längere und intensivere Extraktion des Prokollagens aus dem Rattenbindegewebe eine Erklärung ist, wurde nicht näher untersucht.

Über den Mechanismus der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation ist relativ wenig bekannt. HOVIG (24) und SPAET u. CINTRON (52) haben 1963 bzw. 1964 nachgewiesen, daß nach Kollagenkontakt endogenes ADP aus den Plättchen freigesetzt wird. Seit den Untersuchungen von GAARDNER u. Mitarb. (16) ist ADP als wirksame plättchenaggregierende Substanz bekannt. Seine Wirkung wird allerdings durch eine starke ADP-ase-Aktivität des Plasmas eingeschränkt.

D. HEINRICH (21) hat die Temperaturabhängigkeit der ADP-induzierten Plättchenaggregation in vitro studiert und gezeigt, daß die Plättchenaggregation bei 15-20°C am größten ist. Bei höheren Temperaturen kommt es zu einem vorzeitigen Abbruch der Plättchenaggregation, so daß bei 37°C die ADP-Wirkung nur noch einen Bruchteil der Wirkung bei 15°C trägt.

Die von uns durchgeführten Versuche zum Studium der Temperaturabhängigkeit der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation ergaben ähnliche Befunde. Aus Abb. 7.1. und Abb. 7.2. ist zu ersehen, daß die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation bei 15°C am größten ist. Bei höheren Temperaturen kommt es zu einer deutlichen Hemmung der Plättchenaggregation, so daß bei 37°C nur noch die Hälfte der bei 15°C aggregierten Plättchen in die Aggregate eingehen.

Das identische temperaturabhängige Verhalten der ADP- und Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation unterstreicht die Bedeutung der ADP-Freisetzung aus den Plättchen nach Prokollagenzusatz.

Inzwischen kennt man eine ganze Reihe plättchenaggregierender Substanzen, die endogenes ADP aus den Plättchen freisetzen, z.B. Noradrenalin und exogenes ADP (28, 40).

Noradrenalin und ADP unterscheiden sich aber von Prokollagen dadurch, daß sie auch eine direkte aggregierende Wirkung auf die Plättchen haben. Dies manifestiert sich in einem sofortigen Einsetzen der Plättchenaggregation (Abb. 3.1.) und in einer fehlenden Hemmbarkeit der 1. Phase der Plättchenaggregation durch Adenosinkörper (Abb. 10.2.1.) und Aspirin (40).

Eine zweiphasische Plättchenaggregation konnten wir nur nach Noradrenalinzusatz beobachten. Für ADP ist dies allerdings nach unseren Versuchen mit Hemmkörpern auch wahrscheinlich (vergl. Abb. 10.2.1.), weil sich die hemmende Wirkung der Adenosinkörper lediglich auf die 2. Phase der Plättchenaggregation erstreckt und die initiale, direkte Wirkung von ADP auf die Plättchen nicht unterbunden wird.

Die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation dagegen ist niemals zweiphasisch und erfolgt immer nach einer Latenzphase von 40-60 sec, also ungefähr zu einer Zeit, zu der bereits die 2. Phase der Plättchenaggregation nach ADP- oder Noradrenalinzusatz anläuft. Daß es sich bei der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation und der 2. Phase der Noradrenalin-induzierten Plättchenaggregation um vergleichbare Vorgänge handelt, zeigen auch Ähnlichkeiten in der Änderung der Struktur der Plättchen (32) und das identische Verhalten nach Aspirin-Einnahme. (Nach Aspirin-Einnahme braucht die Adrenalin- und die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation eine gleich lange Zeit bis zur Normalisierung (40).

Im Ausmaß der Aggregation bzw. der während der Aggregation erfolgenden "release-reaction" scheint aber ein Unterschied zu bestehen. So waren in unseren Versuchen die ADP- und die Noradrenalin-induzierte Plättchenaggregation immer reversibel, während wir das bei Prokollagen nie beobachten konnten.

Die Vermutung, daß durch die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation eine umfangreichere "release-reaction" erfolgt als nach ADP- und Adrenalinzusatz, wird durch die Untersuchungsbefunde von MILLS u. Mitarb. (32) gestützt, die nach Prokollagen-induzierter Plättchenaggregation eine wesentlich stärkere Freisetzung von Enzymen aus den Plättchen (z.B.  $\beta$ -Glucuronidase) nachweisen konnten als nach ADP- und Adrenalin-Zusatz. Für die thrombininduzierte Plättchenaggregation gilt dasselbe wie für Prokollagen. Auch hier haben wir eine irreversible Plättchenaggregation, so

daß man annehmen muß, daß die Plättchenaggregation immer dann irreversibel ist, wenn die "release-reaction" ein gewisses Ausmaß erreicht bzw. wenn im Verlaufe der Thrombozytenaggregation Thrombin gebildet wird, welches eine visköse Metamorphose (VM) der aggregierten Plättchen auslöst. Die Bildung von Thrombin wird durch die Freisetzung von Plättchenfaktor 3 aus den Plättchen und eine mögliche Aktivierung von Faktor XII durch Prokollagen induziert.

Das folgende Schema veranschaulicht - in einzelne Schritte zerlegt - die Veränderungen an den Thrombozyten bei der Hämostase:

#### Reaktion der Thrombozyten bei der Hämostase

1. Schritt: ADHÄSION der Thrombozyten (phys.-chem. Reaktion) an Prokollagen
2. Schritt: LOKALE RELEASE-REAKTION (Freisetzung von endogenem ADP)  
induziert durch PRO-KOLLAGEN (Freisetzung von Plättchen-Faktor 3)
3. Schritt: AGGREGATION (reversibel) (Freisetzung von endogenem ADP)  
induziert durch freigesetztes ENDOGENES ADP
4. Schritt: V.M. (irreversible Aggregation) (Freisetzung von endogenem ADP)  
induziert durch THROMBIN (Freisetzung von Plättchen-Faktor 3)  
(Bildung durch Aktivierung von F XII und Freisetzung von PF-3)

Die Konzentration von Prokollagen bestimmt Ausmaß und Geschwindigkeit der Plättchenaggregation. Mit zunehmender Prokollagenmenge wächst die Aggregationsgeschwindigkeit und steigt die Anzahl der Plättchen, die in die Aggregate eingeschlossen werden -  $V_{max}$  und  $P_0 - P_1$  steigen an und  $T_W$  verkürzt sich (vergl. Abb. 4.1.).

Bei Konzentrationen über 30 mg% Prokollagen nähert sich die Zahl insgesamt aggregierender Plättchen einem Grenzwert (im Durchschnitt 80% - vergl. Abb. 1.2.4.). Die maximale Aggregationsgeschwindigkeit  $V_{max}$  nähert sich auch einem Grenzwert, aber erst bei viel höheren Prokollagenkonzentrationen.

Wie D. HEINRICH (21) zeigen konnte, kommt es immer dann zu einer Verminderung von  $V_{max}$  und  $P_0-P_1$ , wenn die Plättchen in ihrer Funktion geschädigt sind, während eine Änderung im plasmatischen System ohne Schädigung der Plättchen nur in einer Verminderung der max. Aggregationsgeschwindigkeit ihren Ausdruck findet - nicht aber in einer Verminderung der Anzahl insgesamt aggregierender Plättchen ( $P_0-P_1$ ). So läßt sich für die in Abb. 4.2. zusammengestellten Aggregationsversuche mit steigenden Prokollagenmengen sagen, daß schon bei den 8 h alten Plättchen eine Schädigung der Funktion vorgelegen haben muß, denn mit 12 mg% Prokollagen beträgt die Anzahl insgesamt aggregierter Plättchen nur 70% und die maximale Aggregationsgeschwindigkeit  $V_{max}$  nur 73% der Norm. Auch die extrapolierte Maximalaggregation bei einer Prokollagenkonzentration von über 30 mg% ergibt für diese Plättchen nur einen Anteil von ca. 60% aggregierter Plättchen zu normalerweise durchschnittlich 80%.

Daß die Fähigkeit der Plättchen, mit Prokollagen zu aggregieren, in vitro bereits nach kurzer Zeit abnimmt, haben wir in Alterungsversuchen zeigen können (vergl. Abschnitt 5). Nach anfänglicher Aktivierung der Aggregationsfähigkeit (vergl. Abb. 5.4.) kommt es ungefähr nach 8 Std. zu einer starken Abnahme der Plättchenfunktion, die dann 30-60 h nach Blutentnahme ihren Endpunkt erreicht.

Zur Bedeutung der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation als Test zur Prüfung der Thrombozytenfunktion läßt sich nach unseren Erfahrungen zusammenfassend folgendes sagen:

Die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation ist ein sehr empfindlicher Indikator der Plättchenfunktion, welcher vor dem Verlust der Retraktionsfähigkeit und vor dem Verlust der Ausbreitungsfähigkeit der Plättchen eine Schädigung der Plättchenfunktion anzeigt.

Pharmaka, die auf die Plättchenaggregation hemmend wirken, gehören den unterschiedlichsten Wirkgruppen an:

Aus der Literatur (26, 27, 28, 44) sind folgende Gruppen bekannt:

1. Antiphlogistika

- a) Salicylate (z.B. Acetyl-Salicylsäure)
- b) Pyrazolone (z.B. Phenylbutazon)
- c) Hydrocortison

2. Adenosin-Derivate

(Adenosin, AMP, cycl.AMP, 2-Chloro-Adenosin, ATP)

3. Antihistaminika

Prometazin (Phenergan)  
Diphenylhydramin (Benadryl)

4. Antiserotonine

Reserpin (Serpasil)  
Phosphatidyl - Serin

5. Sulphydryl-Inhibitoren

(NEM = N-Äthyl-Maleimid)

6. Antiadrenaline

- a)  $\alpha$  -Blocker (Phentolamin = Regitin)
- b)  $\beta$  -Blocker (Propranolol = Dociton)

7. Guanidino-Körper (z.B. ARCAIN)

8. Lokalanästhetika (z.B. Cocain, Novocain)

9. Purin-Körper (z.B. Euphyllin)

Von diesen Hemmstoffen haben wir in unseren Untersuchungen mit Prokollagen besonders Substanzen aus der Gruppe der Antiphlogistica und Adenosin-Derivate untersucht, darüber hinaus auch Vertreter der Antiserotonine, Antiadrenaline, Lokalanästhetica und der Purine. Als besonders wirksam im Sinne der Hemmung der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation haben sich hierbei erwiesen:

1. Antiphlogistika

- a) Salicylate (RG 221, RG 219, Acetyl-Salicylsäure)
- b) Pyrazolone (Phenylbutazon)

2. Adenosin-Derivate (Th 322, Adenosin, ATP)

Weiterhin hat eine Substanz aus der Gruppe der Biguanide (WP 50) und ein  $\alpha$ -Sympathicolyticum (Phentolamin = Regitin) eine deutliche Wirkung auf die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation gezeigt.

Die von uns in Tab. 8.1. zusammengestellten quantitativen Angaben über die Wirksamkeit von Pharmaka in Bezug auf die Hemmung der Plättchenaggregation müssen durch die folgenden Bemerkungen ergänzt werden:

1. Alle untersuchten Substanzen wurden in vitro getestet.  
Die gleiche Hemmaktivität zweier Substanzen bedeutet deshalb noch nicht, daß sie klinisch gleich brauchbar sind. Untersuchungen über Resorption, Elimination und Toxizität sind zusätzlich erforderlich, um die Frage der klinischen Anwendung zu klären.
2. Unsere Versuchsansätze wurden ohne vorherige Inkubation von PRP mit der zu untersuchenden Hemmsubstanz durchgeführt. SOMER u. Mitarb. (50) konnten zeigen, daß bei in-vitro-Untersuchungen von Pharmaka auf ihre plättchenaggregationshemmende Wirkung z.B. im Falle des Harnstoffs ohne Vorinkubation keine Hemmung der Aggregation zu finden ist, während mit Vorinkubation die ADP-induzierte Plättchenaggregation gehemmt ist. Dasselbe wurde auch für die hemmende Wirkung der Adenosin-Derivate beschrieben.

ben (48). Die Vorinkubation bringt aber zahlreiche neue Unbekannte mit sich, die man im einzelnen nicht immer voneinander trennen kann, so z.B.

- a) der eventuelle Um- bzw. Abbau der zu untersuchenden Substanz während der Vorinkubation,
- b) während der Inkubation ablaufende Aggregationsvorgänge an den Plättchen, ausgelöst durch die zu untersuchende Substanz, die dann sekundär - wie für Harnstoff beschrieben (SOMER u.Mitarb. (50)) - eine Plättchenaggregationshemmung vor-täuschen.

Wir haben deshalb auf eine Vorinkubation verzichtet.

3. Im Falle der Acetyl-Salicylsäure konnten wir in Abb. 9.1.1. die unterschiedliche individuelle Empfindlichkeit der Plättchen verschiedener Spender auf hemmende Pharmaka zeigen. Wir haben nicht alle Pharmaka an ausreichend vielen Thrombozytenpopulationen getestet, um für alle plättchenaggregationshemmenden Substanzen Mittelwerte angeben zu können; deshalb haben wir in Tab. 8.1. die jeweils gefundene stärkste Hemmwirkung der Pharmaka berücksichtigt.

Bei der großen Anzahl der plättchenaggregationshemmenden Pharmaka ist die Frage nach dem Wirkungsmechanismus nicht einheitlich zu beantworten. Nach morphologischen Untersuchungen von MANNUCCI u.Mitarb. (28) kann man die plättchenaggregationshemmenden Substanzen in 2 Gruppen einteilen.

1. In eine Gruppe, die keine Veränderungen der Plättchenmorphologie hervorruft; d.h. unveränderte Form und ungehinderte Formation von Pseudopodien (z.B. AMP, Adenosin, 2-Chloro-Adenosin, Acetyl-Salicylsäure).
2. In eine Gruppe, die alle spezifische, aber ähnliche Veränderungen der Plättchenmorphologie verursachen; d.h. kugelförmige Umformung der Plättchen bei Erhaltung der Membranen, keine Pseudopodienbildung (z.B. Cocain, Phenergan, Benadryl, Reserpin, NEM).

Die Hemmsubstanzen dieser letzten Gruppe scheinen die Plättchenmembranen zu schädigen.  $H_2O$ -Eintritt in die Zelle ist die Folge der Schädigung von Transportvorgängen an der Membran. Dies verursacht die Volumenzunahme der Plättchen (Kugelform). Gleichzeitig werden die sich auf der Plättchenoberfläche befindenden Rezeptoren für die Aggregation der Plättchen unwirksam.

Die von uns hauptsächlich untersuchten und als besonders wirksam gefundenen Hemmstoffe aus der Gruppe der Salicylate und der Adenosinabkömmlinge gehören nach den morphologischen Veränderungen der Plättchen zur ersten Gruppe.

Sowohl für die Salicylate als auch die Adenosin-Derivate ist der Wirkungsmechanismus bei der Hemmung der Plättchenaggregation völlig unklar. Allen Hypothesen über die Hemmwirkung der Adenosinkörper liegt die Vorstellung der antagonistischen Wirkung zur ADP-induzierten Plättchenaggregation zugrunde. Diese ADP-induzierte Plättchenaggregation hat für die Überlegungen über den Wirkungsmechanismus der Plättchenaggregation besonders an Bedeutung gewonnen, seitdem man weiß, daß auch andere, plättchenaggrierende Substanzen (z.B. Adrenalin, Kollagen, Thrombin) eine Freisetzung von endogenem ADP aus den Plättchen verursachen. Es gibt im wesentlichen 5 Theorien über die plättchenaggregationsauslösende Wirkung von ADP. Der Wirkungsmechanismus der Plättchenaggregationshemmung durch Adenosin-Derivate erklärt sich in der jeweiligen kompetitiven Hemmung (BORN u. CROSS (4)) der ADP-induzierten Plättchenaggregation.

1. BORN u. CROSS (4) haben 1963 behauptet, daß ADP mit  $Ca^{++}$  und einem hitzelabilen, nicht dialysierbaren Plasmafaktor eine interzelluläre Brücke zwischen den Thrombozyten bildet, die für die Aggregation der Plättchen verantwortlich sei. Dagegen sprechen Befunde von SPAET u. Mitarb. (54), die zeigen konnten, daß man keine spezifische Adsorption von radioaktiv-markiertem ADP an die Plättchenoberfläche feststellen kann.

2. In der von SPAET (51) 1964 mitgeteilten Theorie hat ADP bei der Plättchenaggregation lediglich die Rolle einer Energiequelle. Durch Dephosphorylisierung des ADP zu AMP würde Energie freigesetzt, welche eine unbekannte Bindungsreaktion aktivieren könnte. Somit wäre denkbar, daß Plättchen aggregieren, ohne daß Nucleotide in die interzellulären Bindungen einbezogen würden.
3. ROBINSON u.Mitarb. (46) haben 1965 ebenfalls in der Adsorption des ADP an die Plättchenoberfläche die Ursache für die Plättchenaggregation gesehen. Die Autoren nehmen an, daß durch Adsorption von ADP an die Plättchenoberfläche die Oberflächenladung so verändert wird, daß durch Verminderung der abstoßenden Kräfte der Plättchen die Aggregation ausgelöst wird.
4. Die 1966 von SALZMANN u.Mitarb. (48) mitgeteilte Vorstellung über die Wirkung von ADP bei der Plättchenaggregation ähnelt der 2. Theorie. Die Autoren nehmen einen ständigen Stoffwechselprozeß auf der Plättchenoberfläche an, bei welchem ATP zu ADP abgebaut wird. Die freiwerdende Energie wird für aktive metabolische Prozesse benötigt, welche die Plättchen davor bewahren, klebrig zu werden. Exogenes ADP stört das Reaktionsgleichgewicht und damit den Abbau von ATP bzw. die Energiefreisetzung.
5. Die 1969 von MICHAL u. FIRKIN (31) und MARCUS (29) veröffentlichten Ergebnisse unterstützen die Vorstellung, daß die verschiedensten plättchenaggregierenden Substanzen wie ADP, Kollagen und Thrombin einen Plasmafaktor aktivieren, der seinerseits ADP aus den Thrombozyten freisetzt.

Durch die von uns durchgeführten Untersuchungen haben wir die Frage des Wirkungsmechanismus der ADP-induzierten Plättchenaggregation bzw. deren Hemmung durch Adenosin und dessen Derivate nicht klären können. Es kann aufgrund unserer Ergebnisse lediglich gesagt werden, daß Adenosin und dessen Derivate ATP, cycl.AMP und Th 322 die 2. Phase der ADP-induzierten Plättchenaggregation hemmen und die gebildeten Aggregate vollständig wieder auflösen. Die Human-Prokollagen-induzierte Plättchen-

aggregation wird insgesamt gehemmt aber nicht wieder aufgelöst. Th 322, Adenosin und ATP gehören zu den stärksten Hemmstoffen der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation überhaupt, wobei Adenosin und ATP in ca. 20-30fach höherer Konzentration angesetzt werden müssen, als Th 322, um die gleiche Hemmwirkung auf die Plättchenaggregation zu erreichen. Dieser Befund steht im Gegensatz zu den von DIETMANN u. Mitarb. (14) veröffentlichten Ergebnissen, die eine wesentlich stärkere Hemmung der ADP-induzierten Plättchenaggregation durch Adenosin als durch Th 322 gefunden haben.

Als Erklärung für die unterschiedlichen Befunde kann man wahrscheinlich den nicht identischen Wirkungsmechanismus der ADP-induzierten und Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation in Betracht ziehen. Für die klinisch-pharmakologischen Untersuchungen mit plättchenaggregationshemmenden Substanzen hat das u.U. wichtige Konsequenzen. Bedeutet es doch, daß die durch Hemmung der ADP-induzierten Plättchenaggregation erhaltenen Ergebnisse in ihrer quantitativen Aussage nur mit Vorbehalt auf physiologische Verhältnisse projiziert werden können, da hier sicherlich nicht ADP, sondern eher Prokollagen als Starter einer Plättchenaggregation an der Gefäßwand in Frage kommt.

Die Hemmwirkung der Adenosin-Derivate unterscheidet sich nicht nur quantitativ, sondern auch qualitativ. Wie aus Abb. 10.1.2., Abb. 10.2.1. und Abb. 11 zu entnehmen ist, differiert die Hemmwirkung des zyklischen AMP in Bezug auf die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation von den anderen untersuchten Adenosin-Derivaten in zwei Punkten:

1. Während die anderen Adenosin-Körper sowohl die Plättchenaggregationsgeschwindigkeit ( $V_{max}$ ) als auch die Anzahl aggregierender Plättchen ( $P_0 - P_1$ ) in gleichem Maße hemmen, scheint cycl.AMP im wesentlichen nur die Anzahl aggregierender Plättchen zu vermindern, während die Aggregationsgeschwindigkeit zunächst unbeeinflusst bleibt. Man hat den Eindruck, als ob lediglich die Aggregation vor

Erreichen des Endpunktes plötzlich abbricht. Durch Erhöhen der Konzentration von cycl. AMP kann man letztlich jedoch auch die gesamte Aggregation unterdrücken.

2. Euphyllin und cycl. AMP potenzieren sich in ihrer plättchenaggregationshemmenden Wirkung, während Euphyllin und ein anderer Adenosinkörper, Th 322, sich in ihrer hemmenden Wirkung auf die Plättchenaggregation zueinander antagonistisch verhalten.

ad 1) Die verspätete Hemmwirkung von cycl.AMP läßt sich möglicherweise auf zweierlei Weise erklären. Entweder ist cycl.AMP nicht direkt wirksam, sondern nur ein durch einen Stoffwechselprozeß entstehender Metabolit (der schnelle Abbau von Adenosin-Derivaten wurde von BIRKENHEIER u.Mitarb. (2) beschrieben)

oder cycl.AMP greift erst im Gegensatz zu Adenosin, Th 322 und ATP in einer späteren Phase der Plättchenaggregation hemmend ein.

- ad 2) Von BORN u. CROSS (4) wurden quantitative Angaben über die Konzentration der Adenosin-Derivate gemacht, in denen sie eine hemmende Wirkung auf die ADP-induzierte Plättchenaggregation ausüben. DIETMANN u.Mitarb. (14) konnten zeigen, daß bei den für die Plättchenaggregationshemmung geforderten Konzentrationen in vivo eine starke Vasodilatation zu verzeichnen ist, die eine klinische Anwendbarkeit der Adenosin-Derivate unmöglich macht. Durch die von uns aufgezeigte Potenzierung der hemmenden Wirkung von Adenosin-Derivaten mit anderen hemmenden Pharmaka (z.B. Euphyllin) wird eine Möglichkeit aufgezeigt, durch Verringerung der Konzentration der Hemmsubstanzen eine Verminderung der unerwünschten Nebenwirkungen zu erreichen - bei Erhalten der Hemmwirkung auf die Plättchenaggregation.

Über den Wirkungsmechanismus der Acetyl-Salicylsäure (ASS) bei der Hemmung der Prokollagen-induzierten Plättchenaggregation gibt es ebenfalls nur Vermutungen. Man weiß, daß der Salicylsäureanteil des Aspirins z.T. in wenigen Stunden als Glukuronsäureester, der Rest in etwa 24 Stunden als Salicylsäure ausgeschieden wird. Nach SCHARRER u.Mitarb. (49) ist damit die Wirkung des Salicylsäureanteils bei der Thrombozytenaggregation wenig wahrscheinlich, da die hemmende Wirkung der ASS 2-7 Tage anhält.

Als Angriffspunkt der ASS-Wirkung kommen in Frage:

1. Enzymsysteme:

Nach GRISOLIA u.Mitarb. (18) hemmen ASS und andere Salicylate verschiedene Enzyme, z.B. die Triosephosphatdehydrogenase, die Glutaminsäuredehydrogenase, und die Alkoholdehydrogenase.

2. Plasmaeiweiße:

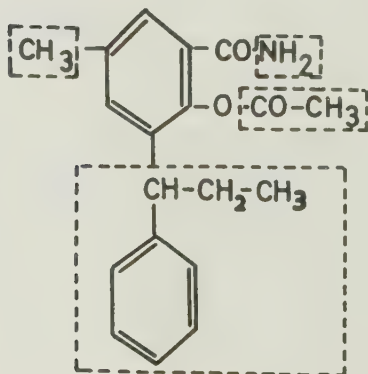
Nach HAWKINS u.Mitarb. (20) werden Eiweißkörper, insbesondere Albumine, durch ASS acetyliert. Für den möglichen Angriffspunkt der ASS an den Plasmaeiweißen spricht die Übereinstimmung der zwischen 2 und 7 Tagen belaufenen Umsatzrate der Eiweißkörper und die 2-7 Tage lange ASS-Hemmung auf Thrombozyten nach einmaliger Gabe.

3. Thrombozyten:

Nach O'BRIEN u.Mitarb. (40) setzt die ASS-Hemmung an den Plättchen direkt an. Die gehemmten Plättchen sind dann nicht mehr fähig, nach Zugabe von ADP, Adrenalin oder Kollagen endogenes ADP freizusetzen. Mit anderen Worten die zweiphasische Plättchenaggregation nach ADP bzw. Adrenalinzusatz wird in der 2. Phase blockiert. Die bis 7 Tage anhaltende Hemmung der Plättchenaggregation erklärt O'BRIEN durch eine gleichzeitig vorliegende Hemmung der Megakaryozyten.

Zusammenfassend können wir sagen, daß wir mit unseren Untersuchungen die Frage des Wirkungsmechanismus der Plättchenaggregationshemmung durch Acetyl-Salicylsäure nicht klären konnten. Wir können lediglich in Bezug auf die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation feststellen, daß

1. ASS die Plättchenaggregation kompetitiv hemmt,
2. ASS die Thrombozyten verschiedener Spender unterschiedlich stark hemmt,
3. ASS die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation weniger stark hemmt als Phenylbutazon und daß
4. der Salicylsäure-Anteil der ASS keine hemmende Wirkung auf die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation hat. Erst durch Substitution am Carboxylende und am Phenolring entstehen Substanzen, die eine mehr oder weniger starke Hemmung der Plättchenaggregation bewirken. Berücksichtigt man alle in Abschnitt 9 mit Salicylsäure-Derivaten gewonnenen Ergebnisse, dann läßt sich eine hypothetische Substanz postulieren, deren plättchenaggregationshemmende Wirkung noch größer sein könnte als die der getesteten Substanzen. Ihre Formel lautet:



Auf die abschließende Frage, welche Bedeutung die von uns durchgeführten Untersuchungen für die Klinik haben, kann man folgendes antworten:

Ausgehend von der vereinfachten Vorstellung, daß in der Initialphase die Thrombose in einer Thrombozytenadhäsion mit nachfolgender Thrombozytenaggregation an der defekten Gefäßwand besteht, diese Plättchenaggregation wiederum durch "release-reaction" einerseits und Strömungshinderung und Stase andererseits intravasal eine Aktivierung des Gerinnungssystems mit Thrombin- und Fibrinbildung verursacht, kann man folgern, daß eine sinnvolle medikamentöse Thromboseprophylaxe bereits in der Initialphase ansetzen muß.

Für in-vitro-Untersuchungen von Pharmaka auf ihre plättchenaggregationshemmende Wirkung scheint uns die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation besonders geeignet, weil Prokollagen vermutlich auch in vivo an der Stelle einer Gefäßwandläsion als plättchenaggregationsauslösendes Agens in Frage kommt.

Die bisher in den Kliniken übliche Thromboseprophylaxe mit Marcumar, Heparin oder Trasylol erscheint uns unter dem Aspekt der Plättchenaggregationshemmung unbefriedigend. In vitro ließ sich von uns jedenfalls in Bezug auf die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation keine Hemmung erzielen. Für diesen Zweck viel besser geeignet erwiesen sich Phenylbutazon und Acetyl-Salicylsäure. Beide Präparate und - wie wir am Beispiel von Acetyl-Salicylsäure zeigen konnten - eine Reihe verwandter Präparate hemmen die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation deutlich.

Daß dies nicht nur in vitro, sondern auch in vivo gilt, haben wir in Abb. 9.4.1. am Beispiel des Phenylbutazons und Oxyphenylbutazons zeigen können. SCHARRER u.Mitarb. (49) haben Acetyl-Salicylsäure seit 1 1/2 Jahren zur Thromboseprophylaxe und Therapie eingesetzt und konnten

vor kurzem überzeugende Ergebnisse veröffentlichen. Da Acetyl-Salicylsäure in der therapeutisch notwendigen Konzentration von  $2 \times 10^{-4} \text{ M}$  (nach DAVISON u. MANDEL (13) wird bereits nach Einnahme von 0,6 g Acetyl-Salicylsäure ein Blutspiegel von ca.  $2 \times 10^{-4} \text{ M}$  erreicht) keinerlei Beeinflussung des Gerinnungssystems bewirkt, erscheint somit bereits die Hypothese, daß zur Thromboseprophylaxe die alleinige Hemmung der Plättchenaggregation genügt, klinisch bestätigt.

## F. Z U S A M M E N F A S S U N G

In der vorliegenden Arbeit wird die Human-Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation und ihre Hemmung durch Pharmaka in vitro untersucht. Zur Bestimmung der Kinetik der Plättchenaggregation bzw. ihrer Hemmung wird die von D. HEINRICH (21) beschriebene lichtoptische Methode gewählt.

Es wird gezeigt, daß die mit dieser Methode erfaßten Parameter zur Bestimmung der Thrombozytenfunktion empfindlicher auf Plättchenfunktionsstörungen reagieren als die von BREDDIN (10) eingeführte Bestimmung der Plättchenausbreitung.

Eine Artspezifität zwischen Human-, Kalb- und Ratten-Kollagen in Bezug auf die Aggregation von Human-Thrombozyten besteht nicht.

Für ein größeres Kollektiv von Spendern und unauffälligen Patienten läßt sich ein Normalverhalten der Plättchen bei Zusatz von Human-Prokollagen zeigen, von welchem sich Patienten mit thromboembolischen Erkrankungen deutlich unterscheiden.

Die Human-Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation ist temperaturabhängig und hat in Bezug auf die Anzahl insgesamt aggregierter Plättchen bei 12-15°C ein Reaktionsoptimum.

Bei insgesamt 36 Pharmaka wurde die hemmende Wirkung auf die Human-Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation untersucht und die Ergebnisse quantitativ verglichen.

Am Beispiel der Salicylsäure wurde gezeigt, daß durch Substitution am Carboxylende und am Phenolring stark hemmende Substanzen zu gewinnen sind. Acetyl-Salicylsäure gehört mit zu den wirksamsten Hemmstoffen der Plättchenaggregation. Diese Hemmung der Prokollagen-induzierten Plättchenaggrega-

tion durch Acetyl-Salicylsäure ist kompetitiv und individuell von Patient zu Patient sehr verschieden.

Phenylbutazon hemmt die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation stärker noch als Acetyl-Salicylsäure.

Am Beispiel von Adenosin-Derivaten und Euphyllin wird gezeigt, daß sich Pharmaka in ihrer Hemmwirkung auf die Prokollagen-induzierte Plättchenaggregation synergistisch und antagonistisch beeinflussen können, wenn sie gleichzeitig gegeben werden.

Die Ergebnisse werden diskutiert und die Bedeutung des Einsatzes von plättchenaggregationshemmenden Pharmaka zur Thromboseprophylaxe betont.

L i t e r a t u r

1. BANKOWSKI, E., S. NIEWIAROWSKI and W. ROGOWSKI:  
Decrease of platelet aggregating activity  
of soluble human collagen fractions  
during ageing.  
Thromb. Diath. haem. 442, (1969)
2. BIRKENHEIER, H., K. DIETMANN und W. SCHAUMANN:  
Hemmung der ADP-induzierten Thrombozyten-  
aggregation durch Adenosin und Adenosin-  
Derivate.  
II. Quantifizierung des Antagonismus zwischen  
ADP und Adenosin in vitro.  
Aus der Forschung der Fa. Boehringer,  
Mannheim-Waldhof (1969)
3. BORN, G.V.R.: Aggregation of blood platelets by adenosine  
diphosphate and its reversal.  
Nature 194, 927 (1962)
4. BORN, G.V.R. and M.J. CROSS:  
The aggregation of blood platelets.  
J. Physiol. 168, 178 (1963)
5. BORN, G.V.R.: Quantitative investigations into the aggrega-  
tion of blood platelets.  
J. Physiol. 162, 67 (1962)
6. BOSSHARDT, D.K. and E.E. HOWE:  
The effect of intravenously injected adeno-  
sine diphosphate in rat and rabbit.  
Thromb. Diath. haem. 21, 42 (1969)
7. BOUNAMEAUX, Y. and H. van CAUVENBERGE:  
Action de la cortison, de l'ACTH et du sali-  
cylate de soude sur les thrombocytes et la  
coagulation sanguine.  
Sang. 25, 889 (1954)
8. BREDDIN, K.: Klinische und experimentelle Untersuchungen  
über die Thrombozytenaggregation bei Gefäß-  
erkrankungen.  
D.M.W. 93, 1555 (1969)
9. BREDDIN, K.: Über die gesteigerte Thrombozytenagglutina-  
tion bei Gefäßkrankheiten.  
Schw. Med. Wschr. 95, 655 (1965)

10. BREDDIN, K. und K.H. BÜRCK:  
Zur Klinik der Thrombozytenfunktionsstörungen  
unter besonderer Berücksichtigung der Ausbrei-  
tungsfähigkeit der Thrombozyten an silikoni-  
sierten Glasflächen.  
Thromb. et Diath. haemorrh. 7, 525 (1963)
11. BROSSMER, R. und H. PATSCHEKE:  
Die Rolle von Kalzium und von Plasmafaktoren  
für die Thrombozytenaggregation.  
Therapiewoche 18, 2113 (1968)
12. CLAYTON, S.G., G.V.R. BORN and M.J. CROSS:  
Inhibition of the aggregation of blood plate-  
lets by nucleosides.  
Nature 200, 138 (1963)
13. DAVISON, C. and G.H. MANDEL:  
Nonnarcotic analgesis and antipyretics.  
I. Salicylates.  
Drill's Pharmacology in Medicine 3. Aufl.,  
297 (1965)
14. DIETMANN, K., H. BIRKENHEIER und W. SCHAUMANN:  
Hemmung der ADP-induzierten Thrombozytenaggre-  
gation durch Adenosin und Adenosin-Derivate.  
II. Korrelation zwischen Hemmung der Aggrega-  
tion und peripherer Vasodilatation.  
Aus der med. Forschung d. Fa. Boehringer  
Mannheim (1969)
15. EVANS, G., M.A. PACKHAM, E.E. NISHIZAWA and J.F. MUSTARD:  
The effect of acetylsalicylic acid on platelet  
funktion.  
J. Exp. Med. 128, 877 (1968)
16. GAARDNER, A., J. JONSEN, S. LALAND, A.J. HELLEM and  
P.A. OWREN: ADP in red cells as a factor in the adhesivnes  
of human blood platelets.  
Nature 192, 531 (1961)
17. GAST, C.F.: Influence of Aspirin on haemostasis.  
Rheum. Dis. 23, 500 (1964)
18. GRISOLIA, S., I. SANTOS and I. MENDELSON:  
Inactivation of enzymes by Aspirin and sali-  
cylates.  
Nature (Lond.) 219, 1952 (1968)
19. GRÖTTUM, K.A.: Platelet surface charge and aggregation  
effects of polyelectrolytes.  
Thromb. Diath. haem. 450, (1969)

20. HAWKINS, D., A.N. PINCHARD and R.S. FARR:  
Acetylation of human serumalbumin by an acetylsalicylic acid.  
*Science* 160, 780 (1968)
21. HEINRICH, D.: Untersuchungen über die Wechselwirkungen zwischen Prokollagen und Thrombozyten  
Inaugural Dissertation Gießen (1968)
22. HELLEM, A.J.: The adhesiveness of human blood platelets in vitro.  
*Scand. J. Clin. Lab. Invest.* 12, Suppl. 51, (1960)
23. HOAK, J.C., E.D. WARNER and G.L. FRY:  
Role of fatty acids in platelet aggregation.  
*Clin. Res.* 16, 304 (1968)
24. HOVIG, T.: Release of a platelet aggregating substance (ADP) from rabbit blood platelets induced by saline "extracts" of tendons.  
*Thromb. Diath. haemorrh.* 9, 264 (1963)
25. KERBY, G.P. and S.M. TAYLOR:  
The role of human platelets and plasma in the metabolism of ADP and AMP added in vitro.  
*Thromb. Diath. haemorrh.* 12, 510 (1965)
26. LOO, I. van de:  
Zur Pathophysiologie der Thrombogenese als Grundlage der Thrombosebehandlung.  
*Med. Klin.* 63, 361 (1968)
27. LUESCHER, E.F.:  
Die Physiologie der Blutplättchen.  
*Schweiz. Med. Wschr.* 98, 1629 (1968)
28. MANNUCCI, P.M. and F. SIRGIVA:  
Effect of inhibitors of aggregation on platelet ultrastructure in vitro.  
*Thromb. Diath. haemorrh.* 21, 354 (1969)
29. MARCUS, A.J.:  
*New Engl. J. Med.* 280, 1213, 1278, 1330 (1969)
30. MARTIN, M. und J. STAUBESAND:  
Intravasale Thrombenbildung durch elektrischen Strom und Thrombolyse.  
Eine elektronenmikroskopische Studie.  
*Thromb. Diath. haemorrh.* 18, 570 (1968)

31. MICHAL, F., and B.G. FIRKIN:  
Ann. Rev. Pharmacol. 9, 95 (1969)
32. MILLS, D.C.B., I.A. ROBB and G.C.K. ROBERTS:  
The release of nucleotides, 5-hydroxy-tryptamine and enzymes from human blood platelets during aggregation.  
J. Physiol. London, 195, 3, 715 (1968)
33. MITCHELL, J.R.A., and A.A. SHARP:  
Platelet clumping in vitro.  
Brit. J. haematol. 10, 78 (1964)
34. MUELLER-ECKHARDT, C. and E.F. LUESCHER:  
Immune reactions of human blood platelets. A comparative study on the effects on platelets of heterologous antiplatelet antiserum, antigen-antibody complexes, aggregated gamma-globulin and thrombin.  
Thromb. Diath. haemorrh. 20, 155 (1968)
35. MURPHY, E.A., H.C. ROWSELL, H.G. DOWNIC, G.A. ROBINSON and J.A. MUSTARD: Encrustation and atherosclerosis. The analogy between early in vivo lesions and deposits which occur in extracorporeal circulation.  
Canad. med. Ass. J. 87, 259 (1962)
36. MUSTARD, J.F.: Blood coagulation in subjects with and without clinical evidence of atherosclerotic vessel disease.  
Canad. med. Ass. J.: 79, 554 (1958)
37. MUSTARD, J.F.: Platelets, thrombosis and vascular disease.  
Canad. med. Ass. J. 85, 621 (1961)
38. NOSSEL, H.L., WILNER, G.D. and E.C. LE ROY:  
Importances of polar groups for initiating blood coagulation and aggregating platelets.  
Nature 221, 75 (1969)
39. O'BRIEN, J.R.:  
J. Clin. Path. 15, 446 (1962)

40. O'BRIEN, J.R.: Effects of salicylates on human platelets.  
Lancet (1968) April 13, p. 779
41. O'BRIEN, J.R.: Aspirin and platelet aggregation.  
Lancet (1968), Jan. 27, p. 204
42. O'BRIEN, J.R.: Effects of anti-inflammatory agents on platelets.  
Lancet (1968), April 27, p. 894
43. O'BRIEN, J.R.: J. Clin. Path. 14, 140 (1961)
44. PACKHAM, M.A., E.E. NISHIZAWA and J.F. MUSTARD:  
Response of platelets to tissue injury.  
Biochem. Pharmacol. 17, Suppl. 1, 171 (1968)
45. QUICK, A.J.: Acetylsalicylic acid as a diagnostic aid in haemostasis.  
Am. J. of Med. Scienc. 254 (1967)
46. ROBINSON, L.W., S.C. KRESS, R.H. WAGNER and K.M. BRINKHOUS:  
Platelet aggregation and deagglutination with a sulphhydryl inhibitor, methyl mercuric nitrat:  
Relationships to platelet ATP-ase.  
Exp. Molec. Path. 4, 457 (1965)
47. ROCHE, BAUMGARTNER, H.R., J.P. TRANZER and A. STUDER:  
An electron microscopic study of platelet thrombus formation in the rabbit with particular regard to 5-hydroxytryptamine release.  
Thromb. Diath. haemorrh. 18, 592 (1968)
48. SALZMANN, E.W., D.A. CHAMBERS and L. LENA:  
Incorporation of labelled nucleotides and aggregation of human blood platelets.  
Thromb. Diath. haemorrh. 15, 52 (1966)
49. SCHARRER, I., M. SCHEPPING und K. BREDDIN:  
Der Einfluß der Acetylsalicylsäure auf die Thrombozytenaggregation in vitro und in vivo.  
Klin. Wschr. 47, 1318 (1969)
50. SOMER, J.B., J.H. STEWART and P.A. CASTALDI:  
The effect of urea on the aggregation of normal human platelets.  
Thromb. Diath. haemorrh. 19, 64 (1968)

51. SPAET, T.H.: The platelets in hemostasis: a morphological and biochemical study.  
Thromb. Diath. haemorrh. 11, 303 (1964)
52. SPAET, T.H. and J. CINTRON:  
Induction of adenosinediphosphate release from human platelets by connective tissue fragments.  
Thromb. Diath. haemorrh. Suppl. 13 (1964)
53. SPAET, T.H. and R.B. ERICHSON:  
"The vascular wall in the pathogenesis of thrombosis"  
Koller, Duchert, Streuli: Pathogenesis and Treatment of Thromboembolic Disease.  
Stuttgart (1966) p. 67
54. SPAET, T.H. and LEJNIEKS ILZE:  
Studies on the mechanism whereby platelets are clumped by ADP.  
Thromb. Diath. haemorrh. 15, 36 (1966)
55. STEFFEN, C., R. TIMPL, J. WOLFF, H. FURTHMAYR und G. WICK:  
Immunbiologie und Immunpathologie des Kollagens.  
Melsunger Mediz. Mitteilungen 41, 27 (1967)
56. WEISS, H.J.: Blutungszeit nach Aspirin-Einnahme.  
Lancet Nr. 7541, 527 (1968)
57. WILNER, G.D., H.G. NOSEL and E.C. LE ROY:  
Aggregation of platelets by collagen.  
J. clin. Invest. 47, 2616 (1968)
58. YOUSSEF, A. and P. BARKHAN:  
Release of platelet factor 4 by adenosine diphosphate and other platelet aggregating agents.  
Brit. Med. J. Nr. 5594, 746 (1968)
59. YOUSSEF, A.H. and P. BARKHAN:  
Inhibition by Aspirin of release of anti-heparin activity from human platelets.  
Brit. Med. J. Nr. 5667, 394 (1969)
60. ZAHARI, J. and F. DREYFUSS:  
An abnormal pattern of adenosine diphosphate-induced platelet aggregation in acute myocardial infarction.  
Throm. Diath. haemorrh. 21, 76 (1969)

61. ZUCKER, M.B. and J. BORELLI:

Platelet clumping produced by connective  
tissue suspensions and by collagen.

Proc. Soc. exp. Biol. Med. 109, 779 (1962)

## Lebenslauf

Ich wurde am 6. März 1945 in Bukarest (Rumänien) als Tochter des Chemotechnikers Stefan Schlesinger und seiner Ehefrau Sofie Schlesinger geb. Folgar geboren.

Im Jahre 1951 wurde ich in die deutsche Elementarschule in Bukarest eingeschult und setzte im Jahre 1958 mein Studium auf dem Gymnasium derselben Schule fort, wo ich 1962 mit Erfolg das Abitur bestand.

Im gleichen Jahr begann ich mit dem zahnmedizinischen Studium an dem Medizinisch-Pharmazeutischen Institut in Bukarest, wo ich bis zum 29.2.1964 immatrikuliert war. Wegen Gewährung einer Ausreisebewilligung aus Rumänien wurde ich am 29.2.1964 exmatrikuliert.

Am 3.4.1964 kam ich mit meinen Eltern in die Bundesrepublik Deutschland und lebte eine zeitlang im Flüchtlingslager Langen (Hessen).

Mein Studium setzte ich an der Medizinischen Fakultät in Frankfurt/M fort. Die ärztliche Vorprüfung bestand ich am 2.10.1965 in Frankfurt/M, die ärztliche Prüfung am 14.2.1969. Am 28.2.1969 heiratete ich Herrn Dieter Heinrich.

Meine Medizinalassistentenzeit absolvierte ich an der Medizinischen Universitätsklinik in Gießen. Am 30. Juni 1970 erlangte ich meine Approbation als Ärztin.

Am 24. August 1970 wurde unsere Tochter Bettina geboren.

Gießen, den 13. November 1970

Margarete Heinrich

Am Ende der Arbeit möchte ich Herrn Prof. Dr.  
L. Róka für die Überlassung des Themas, die Leitung  
der Experimente und die freundliche Unterstützung  
bei der Abfassung der Dissertation danken.





